

**Freisetzung schwer wasserlöslicher Wirkstoffe aus Lipidnanopartikeln –
Entwicklung einer realitätsnahen Untersuchungsmethode**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Elin Roese
aus Frankfurt am Main

1. Referentin:	Professorin Dr. Heike Bunjes
2. Referentin:	Professorin Dr. Judith Kuntsche
eingereicht am:	02.12.2019
mündliche Prüfung (Disputation) am:	27.02.2020

Druckjahr 2020

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Roese E. & Bunjes H.: Drug release studies from lipid nanoparticles in physiological media by a new DSC method. *Journal of Controlled Release* 256: 92-100 (2017).

Göke K., Roese E., Arnold A., Kuntsche J. & Bunjes H.: Control over particle size distribution by autoclaving poloxamer-stabilized trimyristin nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* 13: 3187-3195 (2016).

Tagungsbeiträge

Roese E. & Bunjes H.: Interactions between poloxamer 188 and glycerol at the surface of trimyristin nanoparticles – a DSC study. (Poster) 11th Zsigmondy Kolloquium, Bielefeld (2015).

Roese E. & Bunjes H.: Is poloxamer 188 desorbed from the trimyristin nanoparticle interface upon dilution? A DSC-study. (Poster) 1st European Conference on Pharmaceutics, Reims (2015).

Roese E. & Bunjes H.: Untersuchung des Wirkstofftransfers in Lipidnanopartikeln – Entwicklung einer neuen Methode mittels dynamischer Differenzkalorimetrie. (Poster) 21. Kalorimetrietage, Braunschweig (2015).

Roese E. & Bunjes H.: Drug release studies from lipid nanoparticles by DSC. (Poster) 10th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Glasgow (2016).

Roese E. & Bunjes H.: Investigating drug release from triglyceride nanoparticles into physiological media by DSC. (Vortrag H. Bunjes) Kalorimetrietage, Braunschweig (2017).

Danksagung

In allererster Linie möchte ich mich herzlich bei meiner Mentorin Frau Prof. Dr. Heike Bunjes bedanken, die die vorliegende Arbeit betreut hat. Vielen Dank für das stetige Interesse an meinem Thema, die engagierte Betreuung, die konstruktiven Diskussionen und Ihre Begeisterung für die Wissenschaft.

Bei Frau Prof. Dr. Judith Kuntsche bedanke ich mich für die Anfertigung des Zweitgutachtens und die nette Zusammenarbeit auf der Suche nach Schlonz-Partikeln im „Trio-Projekt“.

Ich danke Frau Prof. Dr. Christel Müller-Goymann für die fachlichen Anregungen bei den Seminarvorträgen, die netten Gespräche in der Mensa und für ihren Beitrag in der Prüfungskommission. Bei Herrn Prof. Dr. Ingo Rustenbeck möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission bedanken.

Für die tatkräftige Unterstützung bei den NMR-Messungen bedanke ich mich bei Frau Dr. Ibrom, Frau Holba-Schulz und Frau Krafft.

Weiterhin danke ich allen Kolleginnen und Kollegen vom Institut für Pharmazeutische Technologie für die angenehme Zeit, die fachlichen Diskussionen und Hilfestellungen und die lustigen gemeinsamen Unternehmungen.

Ein besonderer Dank für die helfenden Hände bei Probenmessungen und bei Problemen mit Computer, Feinmechanik und Elektrik, die gute Zusammenarbeit im Praktikum, die aufmunternden Worte, gelegentliches Zustecken von Süßigkeiten und die gute Laune gilt Napi, Manuela, Carmen, Frau Jahn, Holger und Sven, Christian und Christoph.

Ein Dankeschön von ganzem Herzen spreche ich meinen Mädels aus: Katrin, Sandra, Verena und Anne. Ich bin unendlich dankbar, dass sich unsere Zeit am Institut überschneiden hat und ich mit Freunden zusammenarbeiten durfte. Danke für eure Unterstützung im Labor und im echten Leben, für eure aufmunternden Worte, für die lustigen Dinner-Abende, die Raps-Radtouren und die Kurz-Urlaube. Ohne euch wäre es nicht mal halb so schön gewesen!

Außerdem danke ich herzlich meinem siRNA-Club für wunderbar erfrischende und lustige Momente: Danke Thomas für deine unerschütterliche Hilfe in allen Lebenslagen (obwohl sie dich einiges gekostet hat: Kratzer in Erna, Hemd, halber Finger, ...). Danke Läusi (aka Julius) für deine entschleunigende und unkomplizierte Art – du bist und bleibst die Kohlensäure in unserem Sekt! Ein besonderer Dank gilt Meike: für die weibliche Unterstützung bei den irren Ideen der Jungs, die unendlich vielen snapchat-Bilder, dein stets offenes Ohr, deine

unermessliche Hilfsbereitschaft, für viele Lachanfänge und für fabelhafte Pitch-Perfect-Abende. Danke für eine großartige Zeit in unserem gemütlichen Nest im 2. OG!

Ich danke meiner Lieblings-Tante Ulla für ihre Korrekturen.

Zu guter Letzt und natürlich doch an erster Stelle bedanke ich mich bei meiner Familie für eure bedingungslose Unterstützung – schon mein ganzes Leben lang. Danke für eure Liebe, für euren Rückhalt, für euer Lachen und für euer Vertrauen. Danke Papa, dass du schon seit dem ersten Tag meiner Promotionszeit gefragt hast, wie viele Seiten ich schon geschrieben habe: hätte ich besser gleich auf dich gehört!

Patrick: Danke, dass du immer da bist und stets an unsere Träume glaubst, auch wenn ich mal Zweifel habe.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung.....	1
2	Allgemeiner Teil.....	3
2.1	Kolloidale Arzneistoffträgersysteme.....	3
2.2	Lipidbasierte kolloidale Arzneistoffträgersysteme.....	4
2.2.1	Lipidnanoemulsionen.....	5
2.2.1.1	Kolloidale Lipidemulsionen unterkühlter Schmelzen	6
2.2.2	Lipidnanosuspensionen	7
2.2.3	Kristallisation in kolloidalen Lipiddispersionen	9
2.2.4	Abbau von Lipidpartikeln	11
2.3	Wirkstofffreisetzung aus Lipidnanopartikeln.....	12
2.4	Grenzflächeneigenschaften von Poloxameren	16
3	Material und Methoden	19
3.1	Materialien.....	19
3.1.1	Lipophile Matrices	19
3.1.2	Emulgatoren	19
3.1.3	Modellwirkstoffe.....	21
3.1.4	Physiologische Akzeptormedien	23
3.1.5	Weitere Materialien.....	23
3.2	Methoden.....	24
3.2.1	Herstellung der Lipidnanopartikel	24
3.2.1.1	Akzeptorsysteme.....	26
3.2.1.2	Herstellung von Trimyristin-Dispersionen mit variierender Zusammensetzung	27
3.2.1.3	Einstellung der Poloxamer-Konzentration durch Dialyse	27
3.2.1.4	Einstellung der Poloxamer-Konzentration: Filtrationsversuche Vivaspin®	28
3.2.1.5	Einfluss der Glycerol-Konzentration auf die Kristallisationstemperatur....	28
3.2.2	Charakterisierungsmethoden.....	28

3.2.2.1	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	28
3.2.2.2	Polarisationslichtmikroskopie	29
3.2.2.3	UV-Spektroskopie	29
3.2.2.4	Protonen-Kernspinresonanzspektroskopie (^1H -NMR-Spektroskopie)	29
3.2.2.5	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	30
3.2.2.6	Messungen mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie	31
3.2.3	Wirkstofffreisetzungsuntersuchungen mittels DSC	32
3.2.3.1	Einfluss der Beladungsmenge auf die Kristallisationstemperatur	32
3.2.3.2	Transferexperimente	32
3.2.4	Entwicklung der Freisetzungsuntersuchung mittels DSC	34
3.2.4.1	Reproduzierbarkeitsmessungen	34
3.2.4.2	Maximal mögliche Verdünnung der Donorpartikel	34
3.2.4.3	Optimierung der Messbedingungen – Untersuchungen zur Zeitauflösung	34
3.2.4.4	Einfluss der Verdünnung mit Akzeptormedien auf die Kristallisationstemperatur	34
3.2.4.5	Entwicklung eines Akzeptorsystems - Emulsionen aus vegetabilen Ölen	35
3.2.4.6	Physiologische Akzeptorsysteme - Stabilitätsuntersuchungen	35
3.2.4.7	Physiologische Akzeptorsysteme - Lipase-Blockierung mittels alli [®]	35
3.2.4.8	Physiologische Akzeptorsysteme - Simulation des Lipase-Abbaus	36
4	Versuchsergebnisse und Diskussion	37
4.1	Charakterisierung der verwendeten Lipidnanodispersionen	37
4.2	Untersuchung des Wirkstofftransfers mittels DSC	37
4.2.1	Methodenentwicklung mit Poloxamer 188-stabilisierten Systemen	38
4.2.1.1	Reproduzierbarkeit der Messungen	38
4.2.1.2	Korrelation von Wirkstoffbeladung und Kristallisationstemperatur	39
4.2.1.3	Optimierung der Messbedingungen – Untersuchungen zur Zeitauflösung	40
4.2.1.4	Einfluss der Verdünnung von Donorpartikeln und Akzeptorsystem	41
4.2.2	Akzeptorsysteme – Entwicklung und Charakterisierung	44

4.2.2.1	Physiologische Akzeptorsysteme - Stabilitätsuntersuchungen.....	51
4.2.3	Emulgatoraustausch von Poloxamer 188 gegen Poloxamer 407	55
4.2.4	Methodenentwicklung mit Poloxamer 407-stabilisierten Systemen.....	58
4.2.4.1	Reproduzierbarkeit.....	58
4.2.4.2	Beladung von Poloxamer 407-stabilisierten TM-Partikeln	58
4.2.4.3	Stabilitätsuntersuchungen der Donorpartikel in Schweineserum	61
4.2.4.4	Beurteilung der Verwendbarkeit von Poloxamer 407 zur Stabilisierung in Freisetzungsuntersuchungen.....	63
4.2.5	Transferuntersuchungen	63
4.2.5.1	Generelle Vorbereitungen.....	63
4.2.5.2	Ermittlung der freigesetzten Wirkstoffmenge	65
4.2.5.3	Freisetzungsuntersuchungen in Rapsöl-Nanoemulsion	66
4.2.5.4	Vergleich Poloxamer 188 und 407 in Freisetzungsuntersuchungen mit Fenofibrat	70
4.2.5.5	Freisetzungsuntersuchungen in Schweineserum.....	71
4.2.5.6	Freisetzungsuntersuchungen in Schweineblut	71
4.2.5.7	Untersuchungen zum Einfluss des Wirkstoff-Verteilungsgleichgewichtes auf die Freisetzung.....	74
4.2.5.8	Weitere Anwendungsmöglichkeiten der DSC-Methode: Untersuchung des Lipid-Transfers	76
4.3	Untersuchungen zu Grenzflächeneffekten bei Trimyristin-Nanopartikeln	78
4.3.1	Einfluss des Emulgators auf die Kristallisationstemperatur	79
4.3.2	Einfluss der Glycerolkonzentration auf das Kristallisationsverhalten	81
4.3.3	Indirekte Quantifizierung von gebundenem Poloxamer mittels Dialyse	83
4.3.4	Indirekte Quantifizierung von gebundenem Poloxamer mittels Vivaspin®	89
4.3.4.1	Vorversuche	89
4.3.4.2	Quantifizierung	90

5	Abschlussdiskussion	95
5.1	Einsatz der DSC für Wirkstoff-Transferuntersuchungen	95
5.2	Transferergebnisse.....	99
5.3	Grenzflächenphänomene	101
6	Zusammenfassung	107
7	Literaturverzeichnis	111
A	Anhang	123
A1	Charakteristika der verwendeten kolloidalen Lipiddispersionen	123
A2	¹ H-NMR-Spektrum	125
A3	Verifizierung der Gehaltsbestimmung: Vergleich der photometrisch mit den über Korrelation der Kristallisationstemperatur ermittelten Ergebnisse	126
A4	Poloxamer 188-Kalibriergerade am Refraktometer.....	127

Abkürzungen

$^1\text{H-NMR}$	Proton Nuclear Magnetic Resonance, Protonenker ns pinresonanz
A4F	Asymmetrical flow field-flow fractionation, Asymmetrische Strömungsfeldflussfraktionierung
ACN	Acetonitril
BMV	Betamethason-17-valerat
CMC	Critical Micelle Concentration, kritische Mizellbildungskonzentration
CMT	Critical Micelle Temperature, kritische Mizellbildungstemperatur
Cutt Off	Ausschlussgrenze eines Filters
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Differential Scanning Calorimetry, Dynamische Differenzkalorimetrie
EPR	Enhanced Permeability and Retention, erhöhte Permeabilität und Retention
FB	Fenofibrat
logP	Verteilungskoeffizient
MWCO	Molecular Weight Cut Off, Molekulargewichts-Ausschlussgrenze
n	Stichprobenzahl
NG	Natriumglycocholat
OL	Orlistat
PCS	Photon Correlation Spectroscopy, Photonenkorrelationsspektroskopie
PdI	Polydispersitätsindex
PEO	Polyethylenoxid
PL	Lipoid® S100, Phospholipid mit ungesättigten Alkylketten und mindestens 95 % Phosphatidylcholin
Pol 188	Poloxamer 188
Pol 407	Poloxamer 407
PPO	Polypropylenoxid
Q10	Ubidecarenon

RI	Refraction index, Brechungsindex
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
SGC	Sodium glycocholate, Natriumglycocholat
SL	Saccharoselaurat
T _{Krist}	Kristallisationstemperatur
THF	Tetrahydrofuran
TM	Trimyristin
TMS	Tetramethylsilan
TPA	α -D-Tocopherolacetat
T _s	Schmelztemperatur
Tylox	Tyloxapol
z-Av.	z-Average diameter, Partikeldurchmesser
ΔT_{Krist}	Änderung der Kristallisationstemperatur

1 Einleitung und Problemstellung

Unabhängig von der angestrebten Applikationsart muss jeder Wirkstoff erst molekular gelöst vorliegen, um bioverfügbar zu sein. Viele neu synthetisierte pharmazeutische Wirkstoffe und Wirkstoffkandidaten sind allerdings sehr schlecht wasserlöslich und stellen daher die Pharmazeutische Technologie vor eine große Herausforderung hinsichtlich der Entwicklung pharmazeutischer Formulierungen [1,2]. Um diese Wirkstoffe dennoch nutzen zu können, hat die Forschung an lipidbasierten kolloidalen Arzneistoffträgersystemen in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Durch den Einsatz von lipophilen kolloidalen Trägersystemen, wie zum Beispiel Lipidemulsionen, festen Lipidnanopartikeln, unterkühltsmektschen Lipidnanopartikeln und Liposomen, konnte die Solubilisation von modernen Wirkstoffen mit hoher Lipophilie und schlechter Wasserlöslichkeit ermöglicht werden. Aufgrund ihrer Teilchengröße im Nanometer-Bereich können diese Trägersysteme direkt in die Blutbahn appliziert werden und sind daher besonders für *drug targeting*-Strategien interessant [3]. Das Prinzip des *targetings* basiert auf der Akkumulation der aktiven Substanz im erkrankten Gewebe. Dafür ist eine kontrollierte und vor allem verzögerte Freisetzung des Wirkstoffs notwendig, sodass die Trägerpartikel gemeinsam mit dem inkorporierten Wirkstoff ausreichend lange in der Blutbahn zirkulieren und sich so an der Zielstruktur anreichern können.

Um das Potential und die Einsatzmöglichkeiten dieser kolloidalen Trägersysteme einschätzen und bewerten zu können, sind Kenntnisse über ihr Wirkstofffreisetzungsverhalten nach der Applikation wichtig. Zum jetzigen Zeitpunkt existieren dafür noch keine standardisierten Methoden, denn die in den Pharmakopöen beschriebenen Untersuchungsmethoden zur Freisetzung aus handelsüblichen Arzneiformen wie in den Vorschriften der Wirkstofffreisetzung aus festen Arzneiformen (Ph.Eur. 2.9.3) oder der Wirkstofffreisetzung aus lipophilen festen Arzneiformen (Ph.Eur. 2.9.42) [4] können für kolloidale Trägersysteme nicht ohne Modifizierung übernommen werden. Im Gegensatz zur Situation bei den festen Arzneiformen erschwert die geringe Größe der kolloidalen Trägerpartikel die Trennung von Donor- und Akzeptorsystem erheblich, wodurch sich oftmals auch Trägerpartikel im Freisetzungsmedium befinden können, die wiederum die Analyse des tatsächlich freigesetzten Wirkstoffs stören. Ein weiteres Problem stellt die hauptsächliche Verwendung von wässrigen Akzeptormedien, wie beispielsweise Puffer mit physiologischem pH-Wert, für die Freisetzungsuntersuchungen in vielen Methoden dar [5]. Da die kolloidalen Trägersysteme aber vorrangig parenteral bzw. intravenös appliziert werden, trifft der freigesetzte Wirkstoff unter realen Bedingungen im Blutkreislauf nicht nur auf wässrige, sondern auch auf lipophile

Kompartimente wie (Lipo-)Proteine und zelluläre Bestandteile. Eine Korrelation zwischen den erhaltenen *in vitro*-Ergebnissen aus den Freisetzungsuntersuchungen und der eigentlichen *in vivo*-Situation ist daher nur möglich, wenn die ausgewählte Freisetzungsmethode und das Freisetzungsmedium adäquat an die physiologischen Bedingungen am Applikationsort angepasst sind.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, eine geeignete Methode zur Untersuchung der Wirkstofffreisetzung aus Lipidnanopartikeln zu entwickeln. Die Methode sollte leicht zu handhaben, vielseitig einsetzbar und nicht auf Wirkstoffe mit bestimmten Eigenschaften, wie Fluoreszenz oder radioaktiver Markierung begrenzt sein. Zusätzlich sollte sie die realistischen Bedingungen am Applikationsort möglichst genau widerspiegeln und daher mit physiologischen Medien wie Serum oder Blut durchführbar sein. Aufgrund ähnlicher Partikelgrößen von lipophilen Donorpartikeln und physiologischen Akzeptor-Kompartimenten bestand eine Herausforderung in der Quantifizierung des freigesetzten Wirkstoffs ohne Beeinflussung durch die noch wirkstoffenthaltenden Trägerpartikel.

Vorherige Studien konnten eine Korrelation der Kristallisationstemperatur (T_{Krist}) von Triglycerid-Nanopartikeln mit der enthaltenen Wirkstoffmenge zeigen [6]. Auf Basis dieses Phänomens sollte untersucht werden, ob eine Quantifizierung der freigesetzten Wirkstoffmenge aus Trimyristin (TM)-Nanopartikeln über die Änderung der T_{Krist} ohne vorherige Trennung möglich ist. Die Messung der T_{Krist} sollte mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) erfolgen. Als Akzeptorsysteme sollten physiologische Medien wie Serum und Blut eingesetzt werden, zusätzlich sollte aber auch ein weniger komplexes lipophiles Akzeptorsystem entwickelt werden. Eine Voraussetzung für die Entwicklung dieser Freisetzungsmethode bestand darin, geeignete Formulierungen für die Donor- und Akzeptorpartikel zu finden. Hierbei lag ein besonderer Schwerpunkt auf der Auswahl geeigneter Emulgatoren und deren Beeinflussung der Kristallisationseigenschaften von TM-Partikeln. Vertiefend untersucht wurde in diesem Zusammenhang das Verhalten der Emulgatoren an Partikelgrenzflächen im Hinblick auf Desorptionsprozesse.

Abschließend sollte die Eignung der neu entwickelten Methode durch Transferuntersuchungen mit verschiedenen Wirkstoffen steigender Lipophilie in unterschiedlichen physiologischen Medien beurteilt werden. Dabei sollte herausgefunden werden, welchen Einfluss die Lipophile der Wirkstoffe und welchen Einfluss ein mögliches Verteilungsgleichgewicht auf die Menge an freigesetztem Wirkstoff hat.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Kolloidale Arzneistoffträgersysteme

Die schlechte Wasserlöslichkeit vieler neu synthetisierter Wirkstoffe stellt ein großes Problem dar, denn der molekulardisperse Zustand eines Wirkstoffmoleküls ist eine notwendige Voraussetzung für seine Bioverfügbarkeit. Es werden daher zahlreiche Ansätze verfolgt, um die Löslichkeit hydrophober Substanzen zu verbessern: Neben der Synthese von besser löslichen *Prodrugs* [7] und der Umwandlung in vorteilhafte Modifikationen [8], kommen auch Cosolventien, lösungsvermittelnde Tenside [9] und Komplexbildung mit Cyclodextrinen [10] zum Einsatz. Vor allem die Verwendung von Cosolventien und Tensiden zur Löslichkeitsverbesserung ist zwar wenig aufwendig, birgt aber zum einen die Risiken einer Wirkstoffpräzipitation bei Verdünnung des Systems im Blut und zum anderen die Gefahr von schmerzhaften Gefäß- und Gewebereizungen durch die teilweise nötigen hohen Hilfsstoffkonzentrationen [2,11]. Im Hinblick auf diese Probleme scheint die Inkorporation der Wirkstoffe in nanopartikuläre Trägersysteme eine vielversprechende Alternative zu sein.

Allgemein werden unter Kolloiden disperse Systeme zusammengefasst, in denen Teilchen oder Tröpfchen in einem Dispersionsmedium fein verteilt vorliegen [12]. In kolloidalen Trägersystemen für pharmazeutische Zwecke ist der entsprechende Wirkstoff an eine in Wasser dispergierte Matrix gebunden. Die Partikelgröße der Dispersionssysteme liegt in einem Größenbereich von 1-500 nm [12], wodurch eine parenterale Gabe der Nanopartikel nicht nur ins Gewebe, sondern auch direkt in die Blutbahn möglich ist. Da die im Blut zirkulierenden Nanopartikel einer anderen Verteilung als die der molekular gelösten Substanzen unterliegen, können neben der Solubilisierung von schwer wasserlöslichen Wirkstoffen auch weitere Effekte erzielt werden. Dazu gehört zum Beispiel die Veränderung der Biodistribution von Wirkstoffen und die damit mögliche Erhöhung der Wirksamkeit bei gleichzeitiger Reduktion der Toxizität. Kolloidale Arzneistoffträger werden hauptsächlich durch Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) phagozytiert und reichern sich daher in Leber und Milz an [13,14]. Durch dieses sogenannte passive *drug targeting* lassen sich Erkrankungen dieser Organe effektiv behandeln und toxische Nebenwirkungen in der Peripherie senken [15]. Eine weitere Form des passiven *drug targetings* stellt die Anreicherung von Nanopartikeln in Tumorgewebe aufgrund des sogenannten EPR-Effektes (EPR: enhanced permeability and retention) dar. Dieser Effekt beruht darauf, dass zum einen das Kapillar-Endothel in tumorösem Gewebe erhöht durchlässig und zum anderen die Lymphdrainage vermindert ist [16,17]. Das passive *drug targeting* kann durch Modifikation der Trägerpartikel noch weiter optimiert werden: beispielsweise vermindert

eine PEGylierung der Oberfläche die Opsonierung der Partikel und erhöht dadurch ihre Zirkulationszeit [18], wodurch der EPR-Effekt besser ausgenutzt werden kann. Ein Überziehen der Trägerpartikel mit hydrophilen Makromolekülen kann die Verteilung der Partikel zwischen den einzelnen Organen beeinflussen bzw. die Aufnahme in RES-aktive Organe vermindern [19–21]. Für bestimmte Zielstrukturen ist neben dem passiven auch ein aktives Targeting mit kolloidalen Trägerpartikeln möglich. Hierbei wird die Oberfläche der Nanopartikel mit entsprechenden Liganden versehen, die eine hohe und spezifische Affinität zum Zielgewebe aufweisen [22,23], sodass die Partikel sich entsprechend dort anreichern.

Je nach Zusammensetzung der Matrix unterscheidet man zwischen Polymer- und Lipidsystemen. Polymernanopartikel bilden eine vielfältige Gruppe von Arzneistoffträgern und stehen stark im Fokus der aktuellen Forschung. Sie können sowohl aus natürlichen Polymeren wie zum Beispiel Gelatine, Chitosan, oder Natriumalginat, aber auch aus synthetischen Polymeren wie Polymilchsäure oder Polyalkylcyanoacrylat hergestellt werden [24]. Der gewünschte Wirkstoff kann entweder in die Polymermatrix eingebettet, kovalent gebunden oder auch im Kern des Partikels eingeschlossen sein [25]. Bedingt durch die Herstellungsarten dieser Partikel, wie bspw. die Emulsionspolymerisation oder die Lösungsmittelverdampfungsmethode, können organische Lösemittelrückstände oder verbleibende Monomere toxikologisch problematisch sein.

Eine im klinischen Alltag bereits sehr bedeutsame Gruppe von kolloidalen Arzneistoffträgersystemen stellen lipidbasierte Nanodispersionen dar, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

2.2 Lipidbasierte kolloidale Arzneistoffträgersysteme

Lipidbasierte Dispersionen, oft auch als Lipidnanopartikel bezeichnet, stellen eine große und bedeutende Gruppe der Wirkstoffträgersysteme dar. Die Dispersionspartikel können flüssig, fest oder flüssigkristallin sein oder auch flüssige und feste Komponenten gleichzeitig enthalten [26–28]. Auch strukturell unterscheiden sich die Partikel stark voneinander, so differenziert man beispielsweise Liposomen, Emulsionstropfen oder kubische Nanopartikel [29]. Neben der Löslichkeitsverbesserung schwer wasserlöslicher Arzneistoffe und der Erhöhung der Bioverfügbarkeit besitzen diese Arzneistoffträgersysteme noch weitere Eigenschaften, die sie für Formulierungsstrategien interessant machen. Durch die Verwendung von physiologischen Komponenten und der damit einhergehenden guten Verträglichkeit dieser Materialien haben sie einen großen Vorteil gegenüber den Polymernanopartikeln und gelten im Allgemeinen als physiologisch weniger kritisch [25].

2.2.1 Lipidnanoemulsionen

Lipidnanoemulsionen stellen Systeme dar, in denen die flüssige Lipidphase als Tröpfchen in einer wässrigen Phase fein verteilt vorliegt. Diese Tröpfchen im Nanometerbereich werden durch eine Emulgatorhülle stabilisiert [26].

Aufgrund ihrer physiologischen Kompatibilität werden kolloidale Lipidemulsionen bereits seit Beginn der 1960er Jahre im klinischen Bereich für die parenterale Ernährung eingesetzt [30]. Für die intravenöse Anwendung in Lipidnanoemulsionen kommen allerdings nur entsprechend zugelassene Materialien in Frage: Als Lipidmatrix werden fette Pflanzenöle wie Sojaöl oder Distelöl, mittelkettige Triglyceride und Fischöl verwendet. Als Emulgatoren werden hauptsächlich Phospholipide wie beispielsweise Lecithin eingesetzt [31]. In der Grundlagenforschung hingegen werden noch weitere Matrixkomponenten wie Alkane [32] und synthetische monoacidische Triglyceride untersucht, für deren Stabilisierung Emulgatoren wie beispielsweise Poloxamer 188, Natriumdocecylsulfat, Zuckerester [33], Macrogol-15-Hydroxystearat [34] oder Tyloxapol [35] verwendet werden. Neben der Nutzung als Lipidquelle bei der parenteralen Ernährung werden Lipidnanoemulsionen auch als Trägersysteme für schwer wasserlösliche Arzneistoffe untersucht und eingesetzt. In Deutschland sind zum Beispiel Lipidnanoemulsionen mit Diazepam (Diazepam®-Lipuro), Propofol (Disoprivan®), Etomidat (Etomidat®-Lipuro) und Dexamethason-21-palmitat (Lipotalon®) als Fertigarzneimittel zugelassen [36].

Die Herstellung von arzneistoffhaltigen kolloidalen Lipidemulsionen für pharmazeutische Zwecke erfolgt üblicherweise durch Vordispersgierung der Lipid- und Wasserphase mittels eines Rotor-Stator-Rührwerks, wobei die Tröpfchengröße dieser Präemulsion anschließend durch Hochdruckhomogenisation bis in den Nanometerbereich reduziert wird [31,33,37]. Die resultierenden Partikelgrößen liegen zwischen 50 und 1000 nm, wobei für die parenterale Anwendung eine Größe von unter 500 nm wünschenswert ist [31].

Die Wirkstoffbeladung erfolgt klassischerweise direkt während der Herstellung der Trägersysteme, indem die Substanz in der gegebenenfalls erwärmten Lipidphase gelöst und diese Mischung anschließend wie oben beschrieben weiterverarbeitet wird („*De-novo*-Herstellung“) [31,38]. Diese Art der Wirkstoffbeladung weist einige Nachteile auf: neben dem Zeitaufwand und der Gefahr einer möglichen Überladung der Systeme mit anschließender Auskristallisation des überschüssigen Wirkstoffs, sind der hohe Verbrauch von Wirk- und Hilfsstoffen zu nennen. Besonders in frühen Entwicklungsstadien potentieller Wirkstoffe stellt die nur gering verfügbare Substanzmenge einen limitierenden Faktor dar. Um diese Probleme

zu umgehen, kann der zu formulierende Wirkstoff direkt, in einem organischen Lösemittel gelöst, dem bereits hergestellten Trägersystem zugesetzt werden. Problematisch bei dieser Methode ist vor allem der Einsatz der organischen Lösemittel, die aus Gründen der Toxizität und der physikalischen Stabilität der Emulsion nur begrenzt eingesetzt werden dürfen [39]. Eine passive Beladung ist auch ohne Verwendung von Lösemitteln möglich, indem ein Überschuss der schwer wasserlöslichen Substanz direkt mit einem bereits vorgefertigten kolloidalen Trägersystem inkubiert wird [40]. Anschließend wird der nicht solubilisierte Wirkstoff abfiltriert und die im Trägersystem gelöste Menge quantifiziert. Es ist jedoch zu beachten, dass ein schwer wasserlöslicher Wirkstoff nicht zwingend lipophile Eigenschaften hat und daher auch in Ölen kaum löslich sein kann. Allerdings lässt sich durch Variation der Lipidmatrix das Lösungspotenzial der Emulsionen für Wirkstoffe modifizieren und optimieren [41].

Neben der Formulierung von schwer wasserlöslichen Substanzen können Lipidnanoemulsionen noch weitere Vorteile aufweisen, die sie als Trägersysteme interessant machen: Hierzu zählen unter anderem der Schutz des inkorporierten Wirkstoffs gegen chemische Degradation, die Reduktion von Schmerzen und Irritationen an der Injektionsstelle im Vergleich zu anderen Vehikeln und die Minderung der Wirkstofftoxizität [42–44]. Für eine verzögerte Wirkstofffreisetzung scheinen die Lipidnanoemulsionen zunächst nicht besonders geeignet zu sein: durch die hohe Mobilität der Wirkstoffe in der flüssigen Lipidmatrix [45] erfolgt meist eine schnelle und unkontrollierbare Freisetzung [46,47]. Um allerdings für *drug targeting*-Strategien verwendbar zu sein, müsste der inkorporierte Wirkstoff ausreichend lange mit seinem Träger assoziiert bleiben, damit die Nanopartikel gemeinsam mit dem Wirkstoff das Ziel erreichen. Das scheint nach heutigem Kenntnisstand nur bei Wirkstoffen mit einem sehr hohen Lipid-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log P$ über 9) realisierbar zu sein [48].

2.2.1.1 Kolloidale Lipidemulsionen unterkühlter Schmelzen

Eine Besonderheit unter den Arzneistoffträgern stellen kolloidale Lipidemulsionen dar, deren disperse Phase in Form einer unterkühlten Schmelze vorliegt [37,45]. Als Unterkühlung bezeichnet man die Temperaturdifferenz zwischen der Schmelztemperatur und der T_{Krist} einer Substanz. Bei der Herstellung dieser Trägersysteme mittels Schmelzemulgierung bzw. Hochdruckemulgierung kann beobachtet werden, dass ein verwendetes Lipid unter bestimmten Umständen nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur bzw. unterhalb seiner Schmelztemperatur nicht auskristallisiert, sondern weiterhin im flüssigen Zustand verbleibt. Die davon betroffenen Formulierungen basieren hauptsächlich auf komplexen Glyceridgemischen wie beispielsweise Hartfett oder auf monoacidischen Triglyceriden mit den gesättigten Fettsäuren Laurin (Lau)-

und Myristinsäure (Myr). Diese Triglyceride sind bei Raumtemperatur fest ($T_S =$ Schmelztemperatur: $T_{S\text{ Lau}} = 47\text{ °C}$, $T_{S\text{ Myr}} = 56\text{ °C}$) und können nach Erhitzen durch Schmelzhomogenisation zu kolloidalen Dispersionen verarbeitet werden [37,45,49]. Die starke Unterkühlung im kolloidalen Zustand führt dazu, dass schmelzhomogenisierte Nanodispersionen fester Lipide nicht zwangsläufig auch feste Nanopartikel enthalten. Bei der Verarbeitung von Trilaurin und Trimyristin ist die Unterkühlung so stark, dass die Kristallisation der kolloidalen Partikel erst bei Temperaturen unterhalb der Raumtemperatur stattfindet, sodass man daher bei Raumtemperatur Nanoemulsionen enthält. Dieser Zustand ist thermodynamisch instabil, dennoch lässt er sich unter geeigneten Bedingungen über viele Monate aufrecht erhalten [37,50]. Durch die Lagerung kolloidaler TM-Emulsionen im Kühlschrank bei Temperaturen von 2-8 °C kristallisiert das Lipid schließlich aus und es entstehen Nanosuspensionen. Nanoemulsionen basierend auf dem kurzkettigen Trilaurin können in der Regel erst bei Temperaturen deutlich unter 0 °C zur Kristallisation gebracht werden. Die Rekristallisation von Nanopartikeln aus unterkühlten Triglyceridschmelzen wird zusätzlich auch durch die Partikelgröße und den verwendeten Stabilisator beeinflusst [50]. Das Unterkühlungsphänomen macht es möglich, dass aus einem Herstellungsansatz lediglich durch Veränderung der Lagertemperatur zwei verschiedene kolloidale Trägersysteme (Nanosuspensionen und Nanoemulsionen) mit gleicher Zusammensetzung, aber mit unterschiedlichen Eigenschaften erhalten werden können.

2.2.2 Lipidnanosuspensionen

Lipidnanosuspensionen bzw. feste Lipidnanopartikel bestehen aus einer kristallinen Lipidmatrix, die in einer wässrigen Phase dispergiert vorliegt und von einer Stabilisatorhülle umgeben ist [51]. Als Lipidmatrices werden bei Raumtemperatur fest vorliegende Glyceride, Fettalkohole, Fettsäuren, Wachse und Paraffine eingesetzt und zur Stabilisation werden Emulgatoren wie Lecithin, Gallensalze, Poloxamere oder Polysorbate verwendet [51]. Die Herstellung der Lipidnanosuspensionen erfolgt analog zu der von Nanoemulsionen: nach Vereinigung der gegebenenfalls Wirkstoff enthaltenden Lipidschmelze mit der erwärmten Emulgator-haltigen wässrigen Phase in einer Präemulsion findet die weitere Zerkleinerung durch Hochdruckhomogenisation, Membranextrusion, Mikrokanalemulgierung oder Ultraschall statt. Durch die Verarbeitung von erwärmten flüssigen Lipiden entsteht zunächst eine Nanoemulsion. Erst durch Abkühlen auf eine bestimmte Temperatur kommt es zur Kristallisation des Lipides und zur Ausbildung der festen Lipidnanopartikel.

Die Herstellung mittels Kalthomogenisation ist ebenfalls möglich, wird allerdings eher selten verwendet. Der Wirkstoff muss zunächst in der geschmolzenen Lipidmatrix gelöst werden, nach Abkühlen und Erstarren wird diese Mischung zu Mikropartikeln zermahlen und anschließend in der kalten Tensidlösung hochdruckhomogenisiert [52]. Weitere Methoden zur Herstellung von Lipidsuspensionen beruhen auf verschiedene Arten der Ausfällung zum Beispiel unter Einsatz von organischen Lösemitteln [53,54], aus einer O/W-Mikroemulsion [55] oder auf dem Emulsions-Fällungsverfahren [56]. Nachteilig an diesen alternativen Verfahren ist die geringe Lipid-Konzentration und der Einsatz von organischen Lösemitteln, welche für die parenterale Applikation anschließend aufwendig rückstandslos entfernt werden müssen. Abhängig von der Herstellungsmethode und den Formulierungskomponenten entstehen Nanopartikel im Größenbereich von 30-500 nm [57]. Die häufig verwendeten Triglyceride führen meist zur Ausbildung einer anisometrischen und plättchenartigen Partikelform [58], wodurch eine vergrößerte spezifische Oberfläche im Vergleich zu Emulsionströpfchen entsteht [59].

Lipidnanosuspensionen stellen eine Weiterentwicklung der kolloidalen Fettemulsionen dar [60]. Durch die Verwendung fester Partikel erhoffte man sich eine erhöhte physikalische und chemische Stabilität sowie die Möglichkeit der verzögerten und kontrollierten Wirkstofffreisetzung nach parenteraler Applikation [61]. Die hochgeordnete Packung der kristallinen Lipide bietet allerdings kaum Möglichkeiten für einen Einschluss von Wirkstoffen, sodass die Aufnahmekapazität in der Lipidmatrix begrenzt ist [45,61]. Die vergrößerte Oberfläche plättchenförmiger Partikel hingegen bietet eine höhere Kapazität für die Adsorption von Wirkstoffen [32,62]. Durch die feste Lipidmatrix wurde eine feste Assoziation bzw. ein fester Einschluss des Wirkstoffs in den Partikelkern und durch diese Immobilisation im Vergleich zur flüssigen Matrix eine verzögerte Wirkstofffreisetzung erwartet. Da der Wirkstoff während der Rekristallisation der Lipidmatrix aus dem Kristallgitter an die Partikeloberfläche gedrückt wird [6,45], ist allerdings auch bei Nanosuspensionen eine schlagartige Freisetzung zu beobachten [61,63,64].

Während Lipidnanoemulsionen seit vielen Jahren pharmazeutisch genutzt werden, gibt es im Bereich der Lipidnanosuspensionen zur Zeit noch kein zugelassenes Präparat auf dem Markt [51,65]. Sie werden aber als Trägersysteme für schwer wasserlösliche Wirkstoffe weiter erforscht.

2.2.3 Kristallisation in kolloidalen Lipiddispersionen

Als Kristallisation wird der Übergang eines Stoffes aus einem flüssig-amorphen Zustand in einen strukturierten festen Zustand bezeichnet. Die ungeordneten Moleküle nehmen bei der Kristallisation eine geordnete Struktur in einem Kristallgitter ein. Die Kristallisation verläuft in zwei Teilschritten: Kristallkeimbildung und Kristallwachstum. Die Kristallkeimbildung wird in „homogen“ und „heterogen“ weiter differenziert. Bei heterogener Keimbildung muss ein Kristallisationskeim in Form von Fremdmolekülen, Grenzflächen oder Kristallen den Impuls zum Phasenübergang geben. Bei der homogenen Keimbildung hingegen müssen sich die Moleküle spontan in der Schmelze zu einem Kristallisationskeim zusammenlagern, wofür eine größere Unterkühlung nötig ist [66]. Anschließend erfolgt das Kristallwachstum.

Das Kristallisationsverhalten von Triglycerid-Dispersionen wird seit längerer Zeit untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die T_{Krist} bei einer Verkleinerung der Partikelgröße bis zu einem bestimmten Wert absinkt und dann in etwa konstant bleibt [67]. Erklärt wurde dieses Phänomen durch unterschiedlich ablaufende Kristallisationsprozesse: bei größeren Partikeln erfolgt die Kristallisation über eine heterogene Kristallkeimbildung, während sie bei kleinen Partikeln homogen abläuft. Hierfür ist eine stärkere Unterkühlung erforderlich, sodass Tropfen in kolloidalen Dispersionen bei tieferen Temperaturen erstarren, als das einphasige Bulkmaterial [67].

Bei einer heterogenen Kristallkeimbildung an einer Grenzfläche wird ein anderer Kristallisationsmechanismus postuliert: Durch die Erhöhung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses mit sinkender Partikelgröße resultiert meist eine vermehrte heterogene Kristallkeimbildung [66], die zusätzlich durch grenzflächenaktive Stoffe induziert werden kann. Beispielsweise wurde bei Triglycerid-Dispersionen eine Abhängigkeit des Kristallisationsmechanismus von der Art des Emulgators beobachtet [68]. Der Einsatz von nichtionischen Emulgatoren mit gesättigten Fettsäureketten (bspw. Tween 20, 40, 60 und Brij 35, 58, 78) führte mit steigender Fettsäurekettenlänge zu einer Erhöhung der T_{Krist} um bis zu 4 °C, während die Verwendung von nichtionischen Emulgatoren mit langen ungesättigten Fettsäureketten zu keiner signifikanten Änderung führte. Diese Unterschiede wurden anhand des Ablaufs der Kristallisationskeimbildung erklärt: durch die geordnete Struktur der gesättigten Fettsäureketten an der Grenzfläche wird eine heterogene Kristallkeimbildung des Triglycerids induziert, während bei Emulgatoren mit ungesättigten Fettsäureketten eine homogene Kristallkeimbildung stattfinden muss, weil ihre ungeordnete Struktur nicht als Kristallisationskeim dienen kann [68].

Polymorphie beschreibt das Auftreten mehrerer Kristallstrukturen einer Substanz. Die einzelnen Modifikationen weisen Unterschiede in ihrer Struktur und damit in ihren physikalischen Eigenschaften, wie beispielsweise Schmelztemperatur und Dichte auf [69]. Triglyceride kristallisieren meist zunächst in der metastabilen α -Modifikation. Während der Lagerung oder beim Aufheizen kommt es zu einer Umlagerung, eventuell über die metastabile β' -Modifikation, in die stabile β -Modifikation. Die jeweiligen Modifikationen unterscheiden sich in der Anordnung der Fettsäureketten (Abbildung 1-1), wobei die thermodynamisch günstigste Form diejenige ist, bei der die Fettsäurereste die größte Packungsdichte aufweisen.

Die Interaktion von Triglycerid-Nanopartikeln mit inkorporierten und/oder grenzflächenassoziierten Wirkstoffmolekülen kann zu einer Veränderung ihres Kristallisationsverhaltens führen. So wurde ein linearer Zusammenhang zwischen T_{Krist} und Wirkstoffgehalt von Q10-beladenen Triglycerid-Nanopartikeln gefunden, wobei die T_{Krist} mit steigender Wirkstoffbeladung abnahm [6]. Diese Interaktion führte anscheinend zu einer Orientierung der Triglycerid-Ketten, die die Umlagerung in die β -Modifikation begünstigt. Diese Umlagerung ist jedoch nicht zwangsläufig auf den Einbau des Wirkstoffs in das Kristallgitter zurückzuführen, sondern kann auch durch Wechselwirkungen an der Partikelgrenzfläche erfolgen [70]. Urška Treiber untersuchte den Einfluss ausgewählter Wirkstoffe auf die Kristallisation von Triglycerid-Nanopartikeln in ihrer Masterarbeit. Dazu belud sie eine Pol 188-stabilisierte TM-Emulsion passiv mit Betamethasonvalerat, Diazepam, Fenofibrat, Curcumin oder Propofol und konnte ebenfalls einen linearen Zusammenhang zwischen der Wirkstoffkonzentration und der T_{Krist} zeigen [71].

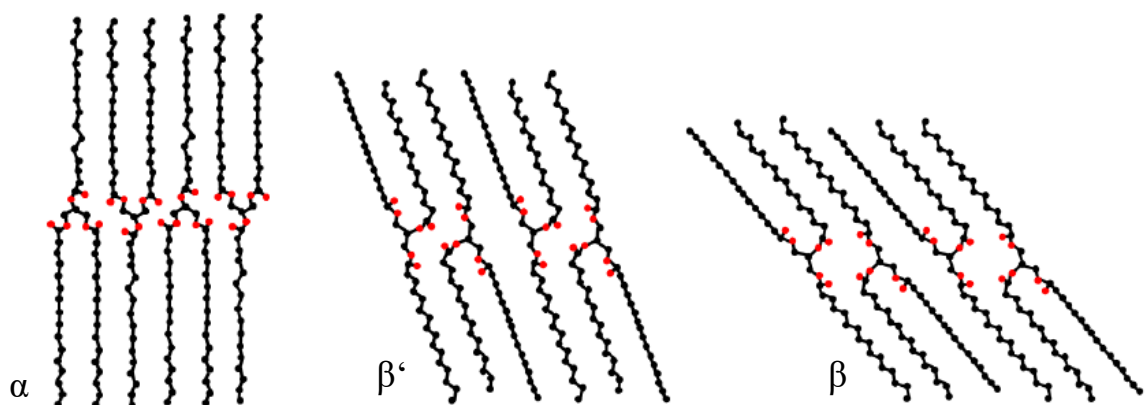


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der molekularen Anordnung von Triglyceriden in den verschiedenen polymorphen Modifikationen [72].

2.2.4 Abbau von Lipidpartikeln

Die Biokompatibilität sowohl von Triglyceriden als auch von Poloxameren ist einer der Hauptgründe, warum diese Materialien für die Herstellung kolloidaler Trägersysteme zur intravenösen Applikation verwendet werden [73,74]. Die Eignung solcher Systeme ist von einer Reihe komplexer physikochemischer und biologischer Faktoren am jeweiligen Applikationsort abhängig, beispielsweise vom pH-Wert oder von der Anwesenheit von Enzymen und immunologischen Proteinen. Diese Faktoren können einen großen Einfluss auf die Trägerpartikel und demzufolge auch auf deren Wirkstofffreisetzung haben. Die Degradation von Triglyceridpartikeln erfolgt unabhängig vom Applikationsweg allgemein über eine enzymatische Hydrolyse durch Lipasen, die die Triglyceride nach und nach in Diglyceride, Monoglyceride und freie Fettsäuren abbauen [75].

Häufig werden bioabbaubare kolloidale Trägersysteme zur intravenösen Verabreichung von Wirkstoffen eingesetzt, wobei es unterschiedliche Wege des Abbaus gibt: entweder unterliegen die Lipidpartikel dem normalen Lipidmetabolismus oder sie werden vom Immunsystem als fremd erkannt. Im zweiten Fall kommt es zur Adsorption von im Plasma vorhandenen Proteinen an die Partikelgrenzfläche (Opsonisierung) und zur anschließenden Aufnahme durch phagozytierende Zellen des Retikuloendothelialen System (RES). Diese entfernen die Nanopartikel aus dem Blutsystem und inaktivieren sie in Organen des Immunsystems (hauptsächlich Niere, Leber, Milz) [76]. Sehr hydrophobe Partikel können auch direkt ohne Opsonierung von Macrophagen aufgenommen werden. Triblockcopolymere werden nicht nur zur Stabilisierung von Dispersionen eingesetzt, sondern auch um die Elimination von Nanopartikeln aus dem Blutstrom zu verzögern. Sie senken durch ihre hydrophilen Polyethylenoxid-Ketten die Grenzflächenhydrophobie der Partikel und verhindern durch die sterische Stabilisierung eine Adsorption von Immunproteinen [77].

Wird durch eine Oberflächenmodifizierung mit Poloxameren der normale Eliminierungsweg über das RES-System umgangen, werden die Triglyceridpartikel über den allgemeinen Lipidstoffwechselweg biologisch abgebaut. Hierbei erfolgt die Hydrolyse in freie Fettsäuren durch die im Endothel verankerte Lipoproteinlipase. Die Fragmente werden anschließend häufig an Albumin gebunden und in Fett- und Muskelgewebe transportiert. Da der inkorporierte Wirkstoff bei einem Abbau des Trägerpartikels zwangsläufig freigesetzt würde, sollte diese Tatsache bei der Entwicklung von neuen Freisetzungsmethoden und bei der Auswahl von Wirkstoffträgersystemen beachtet werden.

2.3 Wirkstofffreisetzung aus Lipidnanopartikeln

Um die Eignung der oben beschriebenen kolloidalen Arzneistoffträger für parenterale Anwendungen beurteilen zu können, sind Kenntnisse zu ihrem Wirkstofffreisetzungsverhalten wichtig. Im Rahmen des *drug targeting* wird eine kontrollierte und verzögerte Freisetzung benötigt. Daher ist eine Methode zur Quantifizierung der freigesetzten bzw. im Trägerpartikel verbleibenden Wirkstoffmenge notwendig, um ermitteln zu können, ob der Wirkstoff ausreichend lange mit dem Träger assoziiert bleibt, um gemeinsam das Target zu erreichen.

Die Untersuchung des Freisetzungsverhaltens kolloidaler Partikel erweist sich in vielerlei Hinsicht als schwierig und kompliziert. In der Literatur wurden bisher viele verschiedene Verfahren zur Untersuchung der Wirkstofffreisetzung aus kolloidalen Trägersystemen beschrieben, die sich grob in vier Gruppen unterteilen lassen [78]:

„Sample-and-Separate“-Methoden

Bei diesen Methoden werden die Wirkstoff-beladenen Trägerpartikel direkt im Freisetzungsmedium inkubiert, wodurch die Freisetzung ungehindert stattfinden kann. Zu bestimmten Zeitpunkten werden Proben gezogen und das Freisetzungsmedium von den Trägerpartikeln abgetrennt, um nur den freigesetzten Wirkstoff quantifizieren zu können. Zur Abtrennung können Filtrations- oder Zentrifugationsmethoden eingesetzt werden [5,61,79]. Allerdings gibt es einige Nachteile dieser Verfahren: Wenn sehr kleine Partikel abgetrennt werden sollen, verlängert sich die Zentrifugationsdauer erheblich und es resultiert eine schlechte Zeitauflösung der Freisetzungsmethode. Zusätzlich kann der Wirkstoff im Verlauf der Zentrifugation noch weiter freigesetzt werden. Bei Filtrationsprozessen kann es zur Wirkstoffadsorption am Filtermaterial und zum Verstopfen des Filters kommen. Der teilweise hohe Energieeintrag kann zusätzlich zur Destabilisierung der Nanopartikel führen [80,81].

Membranbarriere-Methoden (Dialysemethoden)

Die kolloidalen Arzneistoffträger befinden sich bei diesen Methoden meist in einem Dialyseschlauch, der in ein entsprechend großes Volumen Freisetzungsmedium gegeben wird [81]. Da die Dialysemembran nur für die entsprechenden Wirkstoffmoleküle permeabel ist, kann die Quantifizierung des freigesetzten Wirkstoffs ohne vorgeschalteten Trennungsschritt im Freisetzungsmedium erfolgen. Auch bei dieser Methode sind einige Nachteile zu nennen: da die Probe im Dialyseschlauch nicht weiter verdünnt wird, herrschen darin keine Sink-Bedingungen [82]. Zusätzlich stellt die Dialysemembran eine Diffusionsbarriere dar und limitiert durch eine begrenzte Oberfläche den Wirkstoffübertritt, wodurch eine Verzerrung der ermittelten Freisetzungskurve resultiert. Da nicht die Freisetzung

aus den Partikeln, sondern die Diffusion des Wirkstoffs über die Dialysemembran den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt, wird nicht die wahre Kinetik der Freisetzung ermittelt. Als Folge erscheint die Freisetzung häufig viel zu langsam [81–84].

Kontinuierliche Durchflussmethoden

Diese Methoden wurden an Freisetzungsapparaturen im Europäischen Arzneibuch und in der United States Pharmacopeia angelehnt. Die Arzneistoffträger befinden sich in einer Durchflusszelle, die stetig mit frischem oder rezirkulierendem Freisetzungsmedium durchspült wird. Der Boden einer solchen Durchflusszelle wird durch einen Filter bedeckt, wodurch kontinuierlich partikelfreie Proben zur Analyse des freigesetzten Wirkstoffs entnommen werden können. Das entnommene Volumen wird stetig durch Neues ersetzt [82]. Durch den notwendigen Einsatz von Filtrationsschritten zur Abtrennung der Partikel können ähnliche Probleme wie bei den „Sample-and-Separate“-Methoden auftreten. Zusätzlich können Schwankungen der Durchflussgeschwindigkeit durch Verstopfen des Filters oder hohe Fließwiderstände das Freisetzungsprofil beeinflussen [81,82].

***In situ*-Methoden**

Bei *in situ*-Methoden wird der freigesetzte Wirkstoff direkt im Freisetzungsmedium ohne vorherige Abtrennung der Trägerpartikel quantifiziert, sodass der Transfer ohne Zeitverzögerung verfolgt werden kann. Die Methoden sind so konzipiert, dass zwischen dem freien Wirkstoff und dem noch an den Partikeln gebundenen Wirkstoff unterschieden werden kann und die Anwesenheit der Partikel die Quantifizierung der freigesetzten Arzneistoffmenge nicht stört. Hierzu eignen sich unter bestimmten Voraussetzungen die Polarographie oder spektroskopische Methoden wie UV/VIS- und Fluoreszenzspektroskopie. Da aber nur wenige echte Wirkstoffkandidaten die für die entsprechende Detektion erforderlichen Eigenschaften aufweisen, ist die Anwendbarkeit dieser Methoden limitiert [82,85,86].

Zusätzlich zu ihren individuellen Schwächen weisen all diese *in vitro*-Techniken einen gemeinsamen Nachteil auf: bei allen Methoden werden normalerweise rein wässrige Freisetzungsm Medien verwendet, obwohl die Freisetzungskinetik darin deutlich anders aussehen kann als z.B. in Serum [87]. Im Hinblick auf die parenterale, insbesondere die intravenöse Applikation stellt die Verwendung von einfachen wässrigen Medien wie beispielsweise Pufferlösungen für *in vitro*-Freisetzungsuntersuchungsmethoden ein wesentliches Problem dar. Da die hier vorgestellten lipophilen Arzneistoffträgersysteme hauptsächlich zur Formulierung von sehr schwer wasserlöslichen Wirkstoffen eingesetzt werden, ist absehbar, dass deren Verteilung in wässrigen Systemen durch ihre geringe Wasserlöslichkeit limitiert und somit die

Detektion und Analyse der geringen Mengen an freigesetztem Wirkstoff erschwert ist. In einigen Fällen wurde versucht die Löslichkeit, durch solubilisierende Zusätze (z.B. Tween 80) und organische Lösemittel zu verbessern [53,88,89]. Ebenfalls konnte eine Annäherung an *in vivo*-Verhältnisse durch die Supplementierung von Albumin in ein Puffersystem erreicht werden [5]. Dennoch spiegeln diese wässrigen Medien nicht die physiologische Situation im Blutkreislauf wider, wo (Lipo-)Proteine und Zellkomponenten als potenzielle lipophile Akzeptoren für den freigesetzten Wirkstoff fungieren können. Insgesamt sollten die in Freisetzungsuntersuchungen verwendeten Medien an die realen Bedingungen am Applikationsort angepasst werden und demzufolge lipophile Akzeptoren enthalten. Noch besser wäre die direkte Verwendung von physiologischen Medien wie Serum oder Blut. Allerdings ist die Durchführung von Freisetzungsstudien aus kolloidalen Trägersystemen in solch komplexen Medien durch eine ähnliche Partikelgröße von Trägerpartikeln und lipophilen Strukturen im Freisetzungsmedium erschwert. Diese müssen bei den meisten Methoden erst voneinander getrennt werden, um anschließend den Wirkstoff im Freisetzungsmedium bzw. im Akzeptorkompartiment zu quantifizieren.

Um die Wirkstofffreisetzung aus Lipidnanopartikeln adäquat untersuchen zu können, muss also eine Methode verwendet werden, die sowohl die physiologischen Bedingungen am Applikationsort widerspiegelt als auch die Analyse des freigesetzten Wirkstoffs ohne Beeinflussung durch das angewendete Verfahren ermöglicht. In der Literatur sind verschiedene Lösungsansätze zu finden: Die Untersuchung des Wirkstofftransfers von kolloidalen Partikeln in eine lipophile Bulkphase erlaubte eine einfache Trennung von Donor- und Akzeptorkompartiment [64,90]. Da das Akzeptorlipid jedoch nicht dispergiert vorlag, war die für den Wirkstoffübertritt zu Verfügung stehende Grenzfläche nur sehr begrenzt und die Diffusionswege lang, wodurch eine unrealistisch langsame Freisetzung resultierte [64].

Die Zugabe von großen multilamellaren Liposomen zum Freisetzungsmedium sollte durch die höhere spezifische Oberfläche des Akzeptorsystems die physiologischen Bedingungen besser nachahmen und ermöglichte zusätzlich eine einfache Separation vom Donorsystem durch Zentrifugation [91]. Nachteilig an dieser Methode war, dass sich der Wirkstofftransfer während des Separationsschrittes noch fortsetzte und bedingt durch die Zentrifugationsdauer kein schneller Transfer verfolgt werden konnte. Ebenfalls wurden der Einsatz von kleinen unilamellaren Liposomen als lipophile Akzeptorkomponenten getestet, wobei Donor- und Akzeptorpartikel durch eine Ionenaustauschersäule getrennt wurden [92–94].

Ein anderer Ansatz untersuchte den Einbau von lipophilen Akzeptor-Nanopartikeln in Calcium-Alginat-Mikropartikel [95]. Dadurch konnten die Vorteile der kleinen Akzeptorpartikel mit ihrer großen Oberfläche mit den Vorteilen einer einfachen Separation der Donorpartikel von den Mikropartikeln über Filtration kombiniert werden. Insbesondere bei Verwendung von großen Calcium-Alginat-Mikropartikeln wurde der Wirkstofftransfer allerdings durch die Diffusionsbarriere der Hydrogelmatrix der Mikropartikel beeinflusst. Diese schränkte den Transfer ein, da der lipophile Wirkstoff erst durch die hydrophile Gelschicht diffundieren musste, um zu den eingeschlossenen lipophilen Akzeptoren zu gelangen [95].

Eine weitere Möglichkeit stellt die Trennung der kolloidalen Trägerpartikel von größeren Akzeptor-Liposomen mit Online-Wirkstoffquantifizierung durch die asymmetrische Strömungsfeldflussfraktionierung (*asymmetrical flow field-flow fractionation*, A4F) dar [96]. Diese Methode ist allerdings nicht einfach durchzuführen und erfordert ein hohes Maß an Expertise. Eine weitere neu entwickelte Methode, basierend auf der Durchflusszytometrie, erforderte keine Trennung von Donor- und Akzeptorpartikeln und erreichte daher eine gute Zeitauflösung [64]. Mittels dieser Methode wurde der Transfer von Fluoreszenzfarbstoffen aus Lipidnanopartikeln und Liposomen in eine Akzeptoremulsion untersucht. Für einen der Farbstoffe konnte eine Abhängigkeit der Freisetzungsgeschwindigkeit von der Größe der Akzeptor-Oberfläche beobachtet werden: je größer die Akzeptor-Oberfläche war, desto schneller erfolgte der Wirkstofftransfer. Da diese durchflusszytometrische Methode auf der Verwendung von fluoreszierenden (Modell-)Wirkstoffen basiert, ist sie nicht universell einsetzbar.

Um die *in vivo*-Situation noch realistischer nachzustellen, untersuchten mehrere Studien den Wirkstofftransfer in Plasma und Serum [87,96–99]. Decker et al. zum Beispiel haben die Transfereigenschaften des Wirkstoffs Temoporfin aus Liposomen in Lipoproteine und Erythrozyten untersucht. Sie etablierten zu diesem Zweck eine gelchromatographische Methode zur Auftrennung der einzelnen Lipidfraktionen und konnten so einen verstärkten Transfer des Temoporfins zu HDL beobachten [99].

2.4 Grenzflächeneigenschaften von Poloxameren

Poloxamere, auch bekannt unter ihrem Handelsnamen Pluronic[®], werden seit den 1950er Jahren intensiv erforscht und in der Herstellung von Arzneistoffträgersystemen eingesetzt [100]. Sie können sowohl die Löslichkeit als auch die Stabilität von Arzneistoffen erhöhen bzw. verbessern. Durch ihre Verwendung als Genträgersysteme konnte sogar gezeigt werden, dass Poloxamere die Genexpression fördern und als sogenannte biologische Adjuvantien Signalwege aktivieren können [101].

Ihre molekulare Struktur verleiht den Blockcopolymeren vom ABA-Typ einen amphiphilen Charakter: sie bestehen aus einem hydrophoben Polypropylenoxid-(PPO, B-Block)-Zentralblock, der an hydrophile Polyethylenoxid-(PEO, A-Block)-Endblöcke gebunden ist (Abbildung 1-2). Die Herstellung erfolgt durch sequentielle Polymerisation von Ethylenoxid (EO)- und Propylenoxid (PO)-Einheiten. Je nach Polymerisationsgrad ergeben sich amphiphile Substanzen, die in ihren Eigenschaften wie Konsistenz, Molekülgröße oder Hydrophilie/Lipophile (HLB-Wert) unterschiedlich sein können, abhängig von der Anzahl der PPO- und PEO-Einheiten [102]. Die Nomenklatur der Poloxamere gibt Auskunft über ihre genaue chemische Struktur: Die ersten zwei Ziffern multipliziert mit 100 ergeben die durchschnittliche Molekülmasse des Propylenoxidblocks (Pol 188: 1800 g/mol, Pol 407: 4000 g/mol), während die letzten beiden Ziffern den relativen Massenanteil der Ethylenoxideinheiten in Prozent angeben (Pol 188: 80 % m/m, Pol 407: 70 % m/m) [103]. Poloxamer-Moleküle aggregieren ab einer bestimmten Emulgatorkonzentration, der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC). Es entstehen Mizellen mit einem PPO-Kern und einer PEO-Korona. Bei diesen Substanzen ist die CMC stark von der Temperatur des Systems abhängig, sodass es zur Verschiebung von mehreren Größenordnungen innerhalb eines kleinen Temperaturbereichs kommen kann [104]. Zusätzlich besteht eine Abhängigkeit der CMC von der spezifischen Struktur des jeweiligen Poloxamers: je länger die hydrophoben PPO-Ketten sind, desto hydrophober wird das gesamte Molekül, was wiederum zu einer Abnahme der CMC führt [105]. Umgekehrt kann die Verlängerung der PEO-Ketten die Kontakt-Wahrscheinlichkeit von PPO-Einheiten und PEO-Einheiten innerhalb der Mizelle erhöhen,

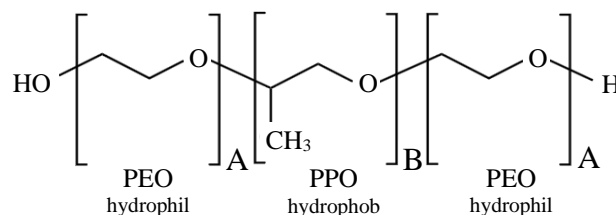


Abbildung 1-2: Chemische Strukturformel der Poloxamere vom ABA-Typ.

wodurch eine Destabilisierung der Mizelle und somit eine Erhöhung der CMC resultiert [105]. Die jeweilige CMC der verschiedenen Poloxamer-Typen ist von großer Bedeutung, da sie ein Maß für die Stabilität der Mizellen bei Verdünnung im Blutstrom darstellt [106]. Poloxamere besitzen oberflächenaktive Eigenschaften, weshalb sie als Emulgatoren und Solubilisatoren, aber auch als schützende Beschichtung für Nanocarrier zur Verlängerung der Zirkulationszeit im Blutkreislauf eingesetzt werden. Hierbei sind die Moleküle mit dem zentralen PPO-Block an der hydrophoben Oberfläche der Trägerpartikel adsorbiert, während die PEO-Ketten in der hydrophilen Phase verbleiben und dort eine sterische Barriere ausbilden [107].

Die Untersuchung der Oberflächeneigenschaften von adsorbierten Blockcopolymeren erfolgte hauptsächlich durch Gleichgewichts- und dynamische Oberflächenspannungsmessungen [108,109], Ellipsometrie [110,111], Neutronenreflektometrie [112] und Oberflächenrheologische Messungen [110,111,113,114] an Luft-Wasser- und Hexan-Wasser-Grenzflächen. Bisher gibt es nur recht wenige Studien zur Adsorption von Poloxameren an Öl-Wasser-Grenzflächen [110,111,115]. Ein Vergleich mit den umfangreichen Studien an Luft-Wasser-Grenzflächen zeigte allerdings ein analoges Verhalten der Polymere an beiden Grenzflächen, sodass daraus einige Kenntnisse abgeleitet werden konnten [113]. Das Adsorptionsverhalten der Poloxamere ist sehr interessant: die Moleküle adsorbieren in unterschiedlichen molekularen Konformationen an hydrophoben Oberflächen, und zwar in Abhängigkeit von der Oberflächenbelegung bzw. der Grenzflächenkonzentration. Die Adsorptionsisotherme zeigt einen Treppen-artiges Aussehen [113,116] und spiegelt den Übergang zwischen einer lockeren planaren Konformation bei geringer Grenzflächenkonzentration zu einer kompakteren Haarnadel-Konformation bei hoher Grenzflächenkonzentration wider. Genauer wird zwischen drei verschiedenen Konformationen unterschieden (Abbildung 1-3): Bei der geringsten Konzentration liegen die Poloxamere planar

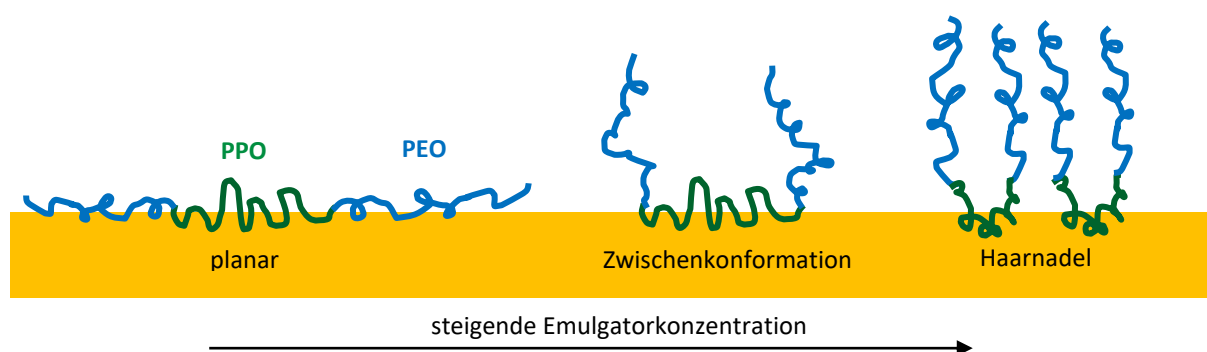


Abbildung 1-3: Konformationen von Poloxamer 188 bei steigender Emulgator-Konzentration an der Grenzfläche (nach [113]).

orientiert vor, sodass die Ketten lang ausgestreckt sind und viele Verankerungspunkte der PPO-Ketten mit der hydrophoben Grenzfläche haben. Bei steigender Konzentration lösen sich die PEO-Ketten von der Grenzfläche, bilden Schleifen aus und die Moleküle nehmen eine Zwischenkonformation ein.

Bei noch höherer Konzentration liegen die Polymermoleküle dicht gepackt in der sogenannten Haarnadel-Konformation vor, wobei die PEO-Ketten in die wässrige Phase hinein ragen und die PPO-Ketten weniger Kontakte mit der Oberfläche aufweisen [113,117,118].

Insgesamt steht das Grenzflächenverhalten von Poloxameren in direktem Zusammenhang mit ihrer spezifischen Molekülstruktur und fundierte Kenntnisse darüber können im Design von Poloxamer-stabilisierten Nanocarriern von großer Bedeutung sein.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Lipophile Matrices

Trimyristin (TM, Dynasan 114, Sasol, Witten, Deutschland) wurde zur Herstellung der Donor-Lipidnanodispersionen verwendet. Es handelt sich um ein gesättigtes Triglycerid der Myristinsäure mit einem Schmelzpunkt von etwa 55 °C.

Mittelkettige Triglyceride (MCT, Miglyol® 812, Caelo, Hilden, Deutschland) sind ein flüssiges Gemisch aus Triglyceriden gesättigter Fettsäuren, hauptsächlich der Capryl- und Caprinsäure.

Raffiniertes Rapsöl (Caelo, Hilden, Deutschland) wurde zur Herstellung von Akzeptorpartikeln im Rahmen der Entwicklung eines Modellblutsystems verwendet. Es ist ein hellgelbes, hochviskoses Öl, das aus dem Samen von *Brassica napus* gewonnen wird. Da es einen geringen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthält (ca. 27 %, Herstellerangaben) weist es eine geringe Oxidationsempfindlichkeit auf.

Raffiniertes Sojaöl (Caelo, Hilden, Deutschland) ist ein pflanzliches Öl und wird aus Sojabohnen gewonnen. Es enthält einen hohen Anteil mehrfach ungesättigter, oxidationsempfindlicher Fettsäuren (ca. 60 %, Herstellerangaben) und unterliegt daher schnellen Abbauprozessen. In dieser Arbeit wurde es in Vorversuchen zur Entwicklung eines Akzeptorsystems verwendet.

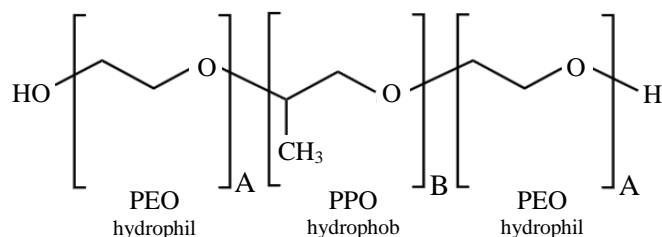
Die folgenden vegetabilen Öle wurden alle von der Firma Caelo in pharmazeutischer Qualität bezogen, unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer Fettsäurefraktionen und wurden lediglich für Vorversuche zur Entwicklung eines Akzeptorsystems eingesetzt: raffiniertes Erdnussöl, raffiniertes Sonnenblumenöl, raffiniertes Sesamöl, raffiniertes Maisöl und raffiniertes Mandelöl.

3.1.2 Emulgatoren

Poloxamere sind nichtionische Blockcopolymere vom ABA-Typ, die aus unverzweigten Ketten mit einem hydrophoben Polypropylenoxid (PPO)- und zwei hydrophilen Polyethylenoxid (PEO)-Teilen bestehen (Tabelle 3-1). Die verschiedenen Poloxamertypen unterscheiden sich in ihrem Polymerisationsgrad und im Verhältnis von Ethylenoxid- und Propylenoxideinheiten.

Tabelle 3-1: Physikochemische Eigenschaften und Struktur der verwendeten Poloxamere [105,119].

Poloxamer	Pluronic®	MW [g/mol]	CMC [25 °C]	A (PEO-Ketten)	B (PPO-Ketten)	HLB
Pol 188	F68	8655	Nicht bestimmbar	76	29	29
Pol 407	F127	12600	0,7 % 0,56 mM	100	65	22



Poloxamer 188 (Pol 188, Lutrol® F68, BASF, Ludwigshafen, Deutschland) wurde anfänglich für die Stabilisierung der Dispersionen eingesetzt. Es weist eine relativ geringe Toxizität auf und wird unter anderem in parenteralen Zubereitungen verwendet [73]. Die wässrigen Lösungen zeigen einen Trübungspunkt von > 100 °C.

Poloxamer 407 (Pol 407, Pluronic® F127, BASF, Ludwigshafen, Deutschland) wurde zur Stabilisierung der Dispersionen für die Freisetzungsuntersuchungen eingesetzt.

Lutrol® F68 und Pluronic® F127 wurden freundlicherweise vom Hersteller kostenlos zur Verfügung gestellt.

Die folgenden Emulgatoren wurden in dieser Arbeit zur Stabilisierung der Dispersionen in den Untersuchungen zu Grenzflächeneffekten bei TM-Nanopartikeln eingesetzt. Eine Übersicht über die physikochemischen Eigenschaften der verwendeten Emulgatoren ist in Tabelle 3-2 dargestellt.

Tyloxapol (Tylox, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) ist ein dickflüssiges, nicht-ionisches O/W-Tensid vom Alkylaryl-Polyether-Alkoholtyp mit einem Molekulargewicht von 258 g/mol und einer sehr niedrigen CMC unter 0,018 mM [120].

Phospholipide stellen die wichtigsten Lipidbestandteile biologischer Membranen dar. Sie sind weitverbreitete Emulgatorgemische, hervorragend verträglich und daher zur parenteralen Applikation zugelassen. Phospholipide werden vor allem aus Sojabohnen oder Eigelb isoliert.

Tabelle 3-2: Übersicht über die physikochemischen Eigenschaften der verwendeten Emulgatoren.

Emulgator	Molekulargewicht [g/mol]	CMC [25 °C]		Quelle
Pol 188	8655	Nicht bestimmbar		[105,119]
Pol 407	12600	0,7 %	0,56 mM	[119]
SL	524	0,019 %	<0,5 mM	[121]
Tylox	258	0,06 %	0,018 mM	[120], Herstellerangabe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde **Lipoid® S100** (PL, Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland) verwendet. Es ist ein Soja-Phospholipid mit ungesättigten Alkylketten und mindestens 95 % Phosphatidylcholin.

Natriumglycocholat (NG, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gehört zu den physiologisch vorkommenden Gallensalzen. Gallensäuren besitzen Tensidcharakter und spielen in der Solubilisation von schwer wasserlöslichen Produkten der Fettverdauung eine große Rolle. In Kombination mit Phospholipiden sind sie gut verträglich [122].

Saccharoselaurat (SL, Mitsubishi-Kagaku Food Corporation, Tokio, Japan) ist ein Zuckerester und enthält 78-81 % Saccharosemonolaurat mit einem Molekulargewicht von 524 g/mol. Es wird als nichtionischer Emulgator zur Stabilisierung eingesetzt und weist eine CMC von unter 0,5 mM auf [123].

3.1.3 Modellwirkstoffe

In dieser Arbeit wurden verschiedene Wirkstoffe verwendet, die sich hinsichtlich ihrer Lipophile, ausgedrückt als logP-Wert, unterscheiden. Ihre physikochemischen Eigenschaften sind in Tabelle 3-3 zusammengestellt, die Strukturformeln lassen sich aus Abbildung 3-1 entnehmen.

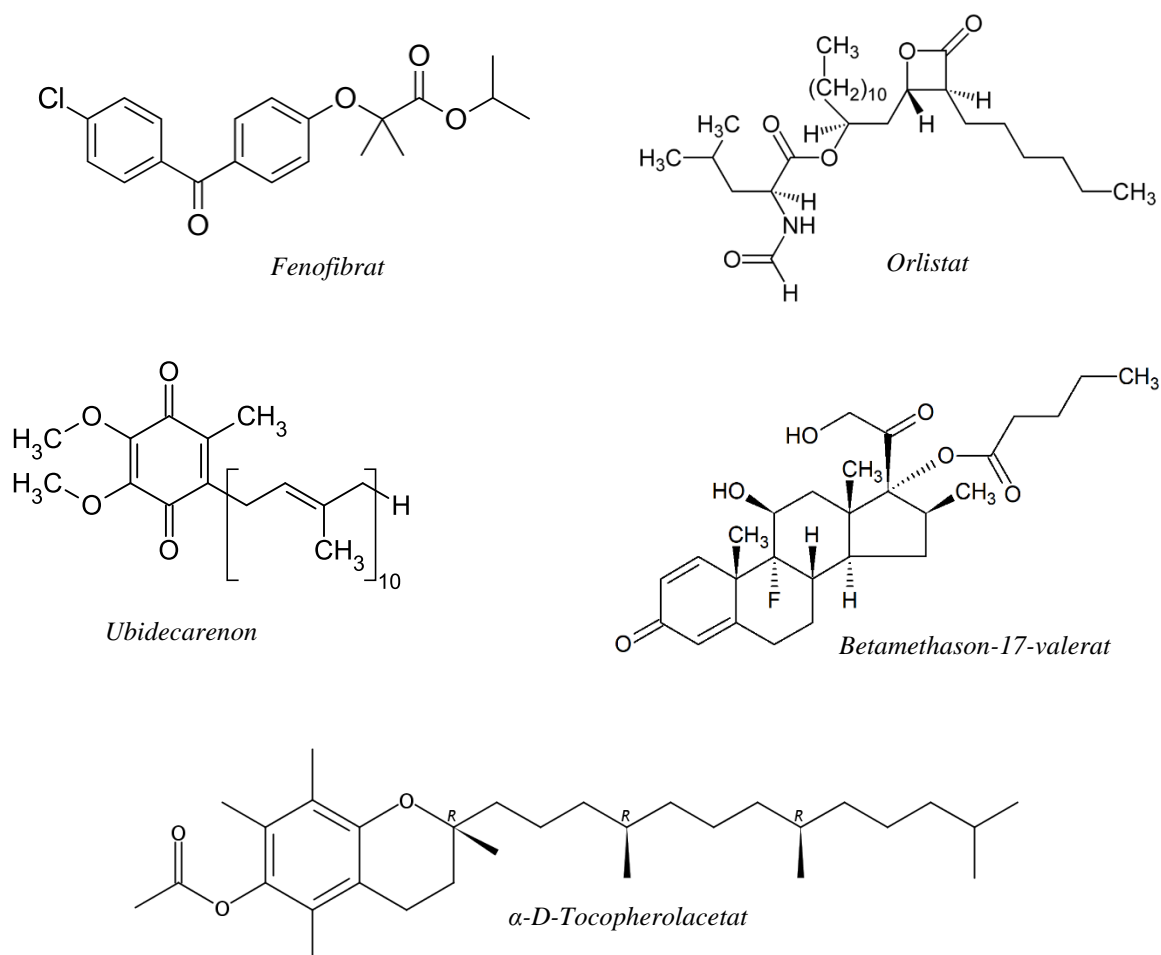
Fenofibrat (FB, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) ist ein Fibrinsäurederivat und wird zur Senkung der Blutfettwerte bei Hypertriglyceridämie und gemischter Hyperlipidämie eingesetzt. Der Wirkstoff findet in nanokristalliner Form beispielsweise im Arzneimittel Lipidil 145 One® Anwendung [36].

Orlistat (OL, Tetrahydrolipstatin, Formosa Laboratories Inc., Toyuan, Taiwan) ist ein Derivat des Lipstatins und wird von *Streptomyces toxytricini* produziert. Es wird als Inhibitor gastrointestinaler Lipasen zur Therapie der Adipositas eingesetzt [36].

Tabelle 3-3: Physikochemische Eigenschaften der untersuchten Wirkstoffe

Wirkstoff	Abkürzung	logP*	MW [g/mol]*	T _s [°C]*
Fenofibrat	FB	5,80 ± 0,39	360,83	80,5
Orlistat	OL	7,00 ± 0,38	495,73	39-41
α-D-Tocopherolacetat	TPA	10,69 ± 0,36	472,74	-27,5
Ubidecarenon	Q10	19,12 ± 0,74	863,34	48-50
Betamethason-17-valerat	BMV	4,14 ± 0,62	476,58	183-184

*Die Daten wurden der Datenbank SciFinder entnommen

**Abbildung 3-1:** Chemische Strukturformeln der verwendeten Wirkstoffe.

α-D-Tocopherolacetat (TPA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) ist ein synthetisches Vitamin-E-Derivat in öliger Form und wird im Körper zu Vitamin E umgewandelt. Es gehört zu den Provitaminen und wird unter anderem als Antioxidans verwendet.

Ubidecarenon (Q10, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) ist eine fettlösliche Substanz mit struktureller Ähnlichkeit zu den Vitaminen E und K und gehört chemisch zu den Ubichinonen [124].

Betamethason-17-valerat (BMV, Caelo, Hilden, Deutschland) gehört zu den stark wirksamen Glucocorticoiden und wurde in dieser Arbeit lediglich in der Entwicklungsphase der Freisetzungsuntersuchungen eingesetzt.

3.1.4 Physiologische Akzeptormedien

Vollblut vom Schwein wurde von einem lokalen Schlachthaus bezogen. Es wurde direkt nach der Schlachtung mit einer Natriumcitratlösung (Endkonzentration 3,8 %) als Antikoagulans versetzt und anschließend bei 8 °C im Kühlschrank für maximal 48 Stunden aufbewahrt.

Schweineserum wurde von Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland kommerziell erworben. Nach dem Aliquotieren wurde es bei -20 °C eingefroren und direkt vor Verwendung schonend in lauwarmem Wasser aufgetaut.

3.1.5 Weitere Materialien

Wasser für die Herstellung der Dispersionen wurde durch Bidestillation gewonnen. Das für die Verdünnungen in den PCS-Messungen verwendete Reinstwasser wurde mittels Filtration und Entionisierung (EASYpure TM LF, Barnstead, USA) hergestellt. Zur Temperierung des Hochdruckhomogenisators wurde demineralisiertes Wasser verwendet.

Alle weiteren Materialien sind in Tabelle 3-4 aufgeführt.

Tabelle 3-4: Zusammenstellung weiterer Materialien

Material	Hersteller	Funktion/Reinheit
Glycerol 98 %	Carl Roth, D-Karlsruhe	Isotonisierungsmittel
Natriumazid p.a.	Carl Roth, D-Karlsruhe	Konservierungsmittel
Chloroform	Fisher Scientific, D-Schwerte	HPLC-Qualität
Chloroform D1 mit TMS (0,03 Vol %)	Carl Roth, D-Karlsruhe	NMR-Qualität
Methanol	Sigma Aldrich, D-Steinheim	HPLC-Qualität
Methanol D4 mit TMS (0,03 Vol %)	Carl Roth, D-Karlsruhe	NMR-Qualität
Benzoessäure	Fluka Chemie GmbH, D-Neu-Ulm	NMR-Qualität
Tetrahydrofuran (THF)	Fisher Scientific, D-Schwerte	HPLC-Qualität

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung der Lipidnanopartikel

Die untersuchten Lipidnanopartikelformulierungen wurden mittels Hochdruckhomogenisation hergestellt. In Abbildung 3-2 ist schematisch die Herstellung der TM-Donorpartikel und die der Rapsöl-Akzeptorpartikel dargestellt. TM-Nanopartikel wurden als Donorpartikel verwendet und setzten sich aus 10 % (w/w) TM als Lipidmatrix und 5 % (w/w) Emulgator zusammen. In der Entwicklungsphase wurde zunächst Poloxamer 188 (Pol 188) als Stabilisator verwendet, später aber gegen Poloxamer 407 (Pol 407) ausgetauscht. Der jeweilige Emulgator wurde unter Rühren in der wässrigen Phase gelöst. Diese enthielt zusätzlich 2,25 % (w/w) Glycerol

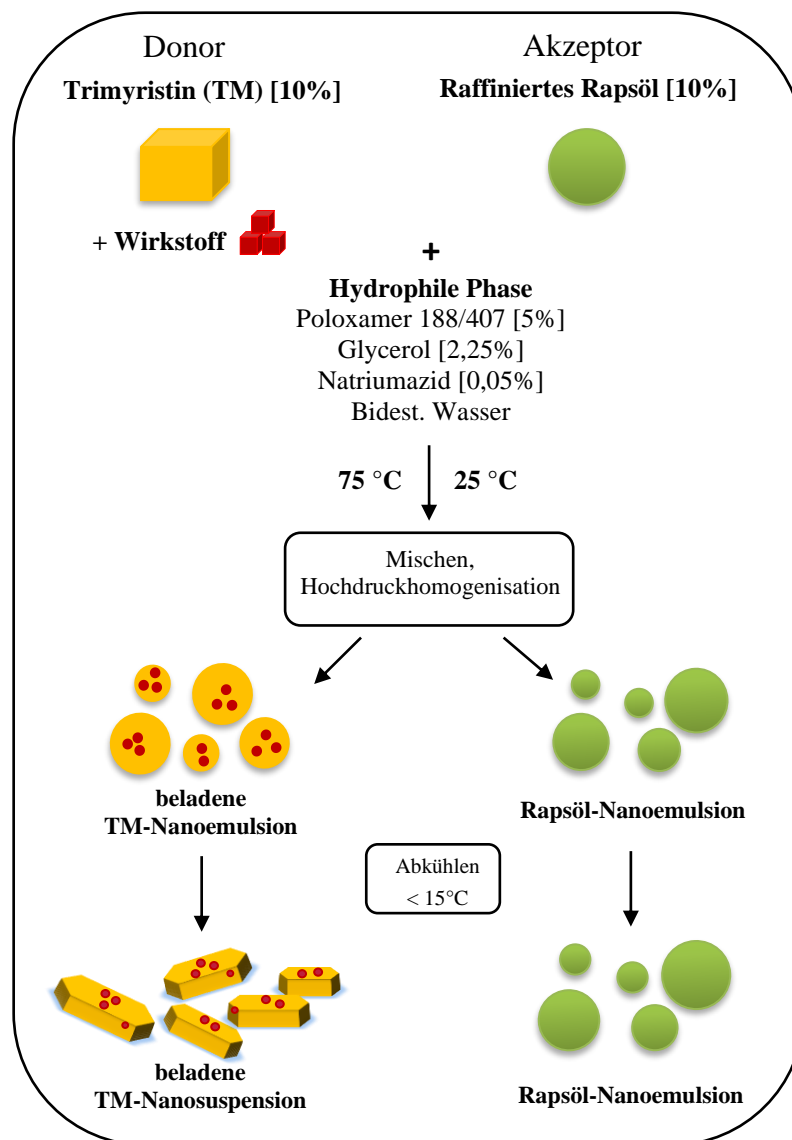


Abbildung 3-2: Schematischer Überblick über die Herstellung der Trimyristin-Donorpartikel und der Rapsöl-Akzeptorpartikel mittels Hochdruckhomogenisation (Microfluidizer). Konzentrationen sind auf den gesamten Ansatz bezogen.

zur Isotonisierung und 0,05 % (w/w) Natriumazid zur Konservierung. Die Konzentrationsangaben beziehen sich jeweils auf den Gesamt-Ansatz.

Die Lipid- und die wässrige Phase wurden getrennt voneinander vorbereitet und anschließend mit Hilfe eines Ultra-Turrax (T25, IKA, Staufen, Deutschland) für vier Minuten bei ca. 6000 rpm vordispersiert. Dieser Prämix wurde dann in 10 Zyklen (entspricht etwa vier Minuten bei 50 ml Ansatzgröße) bei einem Druck von 350-1200 bar hochdruckhomogenisiert (Microfluidizer M110-PS, Interaktionskammer Typ F12Y DIXC, Microfluidics, Newton, USA). Der Homogenisierdruck richtete sich nach der gewünschten Partikelgröße, wobei niedrigere Drücke zu größeren Partikeln führten: So konnte innerhalb von 10 Zyklen bei einem angelegten Prozessdruck von 350 bar eine mittlere Partikelgröße von ca. 150 nm und bei 900 bar eine Partikelgröße von ca. 100 nm erreicht werden.

Alle Prozessschritte wurden bei ca. 75 °C durchgeführt: Zur Temperierung wurde der Homogenisator vorher mit heißem demineralisiertem Wasser gespült. Lipid- und wässrige Phase, Ultra-Turrax und Interaktionskammer des Microfluidizer wurden ebenfalls vorher in einem Wasserbad temperiert. Die so hergestellten Emulsionen wurden in noch heißem Zustand entweder durch 0,22 µm Polyethersulfon-Spritzenvorsatzfilter (PES, Roth Karlsruhe, Deutschland) oder durch 0,45 µm Polyvinylidenfluorid-Spritzenvorsatzfilter (PVDF, Rotilabo® Roth, Karlsruhe, Deutschland) in Injektionsgefäße (2-100 ml Klarglas Glasart I Europäisches Arzneibuch, Zscheile & Klinger, Hamburg, Deutschland) filtriert. Die jeweiligen Filter wurden nach der erwarteten Partikelgröße ausgewählt, wobei ab einem mittleren Partikeldurchmesser von ca. 120 nm die Filter mit der höheren Porengröße eingesetzt wurden. Anschließend wurden die Emulsionen auf Raumtemperatur abgekühlt.

Der Microfluidizer hat zwei verschiedene Vorlagebehälter zur Auswahl, sodass entweder ein kleiner Ansatz von 50 ml oder ein großer Ansatz von ca. 200 ml homogenisiert werden konnte. Da das TM erst im nanopartikulären Zustand stark unterkühlte Schmelzen bildet, bestand am Anfang der Homogenisierung erhöhte Gefahr, dass das TM auskristallisiert, sobald der Probenansatz eine bestimmte Temperatur unterschreitet. Um dies zu verhindern wurde der kleine Vorlagebehälter mit einem Styropormantel umkleidet und der große Behälter mit einer von außen angelegten Heizschlange temperiert. Bei Verarbeitung von flüssigen Matrixlipiden konnte auf die Temperierung verzichtet werden. Für die Wirkstofftransferuntersuchungen wurden die Nanoemulsionen mit schwer wasserlöslichen Wirkstoffen beladen, wobei zwei verschiedene Methoden zur Beladung verwendet wurden:

Aktive Beladung: Der entsprechende Modellwirkstoff wurde zu der lipophilen Phase eingewogen, direkt in der TM-Schmelze gelöst und das System anschließend unter den oben beschriebenen Bedingungen weiterverarbeitet. Nach der Herstellung wurde die Abwesenheit von Wirkstoffkristallen polarisationslichtmikroskopisch untersucht.

Passive Beladung: Die TM-Nanopartikel wurden ohne Wirkstoff unter den oben beschriebenen Bedingungen hergestellt. Anschließend wurde der zu untersuchende Wirkstoff in der einzuarbeitenden Menge als Pulver oder Flüssigkeit in kleine Injektionsgefäße (2 ml) vorgelegt und die Donorpartikel in entsprechender Menge zugegeben. Die verbördelten Proben wurden auf einem Horizontalschüttler (ELMI Sky Line Analog Orbital Shaker S-3.02L, ELMI Ltd., Riga, Lettland) bei 200 rpm solange bewegt, bis der Wirkstoff optisch nicht mehr sichtbar war (nach ca. 24-72 Stunden, abhängig von den physikochemischen Charakteristika des verwendeten Wirkstoffs). Alternativ wurde ein Überschuss an Wirkstoff verwendet und die Inkubation nach einer bestimmten Zeit abgebrochen [40], wonach die Dispersion durch einen 1-2 µm Glasfaserfilter (Rotilabo® Fiberglas Spritzenvorsatzfilter) filtriert wurde, um ungelösten Wirkstoff abzutrennen. Durchschnittlich wurde von einer Beladungsdauer von ca. drei Tagen ausgegangen.

Die Nanoemulsionen wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt, sodass die TM-Partikel im flüssigen Zustand verblieben und stabile Emulsionen unterkühlter Schmelze bildeten [37]. Mit Hilfe der DSC wurde der Emulsionszustand überprüft.

Alle verwendeten Partikelchargen werden an entsprechender Stelle in dieser Arbeit unter ihrem internen Probenamen erwähnt. Die genaue Zusammensetzung sowie die Charakteristika der Partikel sind im Anhang A1 dargestellt.

3.2.1.1 Akzeptorsysteme

Um den Anteil an lipophilen Komponenten im Blut zu simulieren, wurden O/W-Nanoemulsionen als einfache Akzeptorsysteme hergestellt. Dazu wurden 10 % (m/m) der jeweiligen Lipidmatrix und 5 % (m/m) des entsprechenden Emulgators in einer wässrigen Phase mit 2,25 % (m/m) Glycerol und 0,05 % (m/m) Natriumazid im Microfluidizer hochdruck-homogenisiert. Die Herstellung erfolgte bei Raumtemperatur analog zu den TM-Partikeln. Als Lipidmatrices wurden verschiedene raffinierte vegetabile Öle wie Raps-, Mais-, Sesam-, Erdnuss- und Sojaöl (alle Caelo, Hilden, Deutschland), Triglyceride wie Trilaurin (Dynasan 112) und Miglyol 812 verwendet. Zur Stabilisierung wurden entweder Pol 188 oder Pol 407 eingesetzt, jeweils analog zu dem in den Donorpartikeln verwendeten Stabilisator.

Tabelle 3-5: Übersicht der in der Methodenentwicklung und in den Untersuchungen zu Desorptionseffekten verwendeten Emulgatoren.

Emulgator	Abkürzung	Konzentration [%]*
Poloxamer 188	Pol 188	5,0
Poloxamer 407	Pol 407	5,0
Tyloxapol	Tylox	5,0
Saccharoselaurat	SL	5,0
Lipoid S 100	PL/SGC	2,4
+ Natriumglycocholat		+ 0,6

*bezogen auf die Gesamtmenge des verwendeten Ansatzes

3.2.1.2 Herstellung von Trimyristin-Dispersionen mit variierender Zusammensetzung

Im Zuge der Methodenentwicklung und zur Untersuchung möglicher Desorptionseffekte der Emulgatormoleküle von Partikelgrenzflächen wurden TM-Dispersionen mit variierender Zusammensetzung hergestellt. Als Lipidmatrix wurde stets TM in Konzentrationen von 10 oder 20 % (m/m) verwendet, während zur Stabilisierung unterschiedliche Emulgatoren eingesetzt wurden (in Tabelle 3-5 aufgelistet), um den Einfluss auf die T_{Krist} zu untersuchen. Alle Emulgatoren wurden dazu direkt vor der Herstellung in der wässrigen Phase unter Rühren gelöst, wobei die Lipoid S 100/ Natriumglycocholat-Mischung bereits 24 Stunden früher in der wässrigen Phase dispergiert wurde. Die wässrige Phase enthielt immer 0,05 % (m/m) Natriumazid zur Konservierung und zumeist 2,25 % (m/m) Glycerol. Es wurden aber auch Systeme ohne Glycerol-Zusatz in gleicher Weise hergestellt, um einen möglichen Einfluss der Glycerol-Konzentration auf die T_{Krist} zu untersuchen.

3.2.1.3 Einstellung der Poloxamer-Konzentration durch Dialyse

Um den Einfluss von unterschiedlichen Pol 188-Konzentrationen auf die Kristallisation der TM-Nanopartikel zu untersuchen, wurde die Konzentration des Emulgators in der Wasserphase mittels Dialyse eingestellt. Dazu wurden die entsprechenden Dispersionen in einem Dialyseschlauch (MWCO 100 kDa, Celluloseester, Spectra/por Biotech, SpectrumEurope, Breda, Niederlande) in unterschiedlich konzentrierte Pol 188-Lösungen eingebracht [64] und mit einem Magnetrührer leicht bewegt. Der Pol-Gehalt im Dialysemedium wurde durch Dreifachmessung des Brechungsindex bestimmt (Refraktometer: Abbemat-WR, Anton Paar, Ostfildern-Scharnhausen, Deutschland). Die Proben wurden ca. 14 Tage in dem jeweiligen Dialysemedium belassen, bis eine konstante Pol-Konzentration erreicht wurde, die als Ende der Gleichgewichtseinstellung gewertet wurde. Das Volumenverhältnis zwischen Dispersion und

Dialysemedium betrug 1:200 und die Dialyse wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Kalibrierung am Refraktometer erfolgte mit Pol-Lösungen bekannter Konzentrationen.

3.2.1.4 Einstellung der Poloxamer-Konzentration: Filtrationsversuche Vivaspin®

Um die Pol-Konzentration in der wässrigen Phase von Nanodispersionen ohne den Einsatz der Dialyse zu variieren, wurden unbeladene mit Pol 188-stabilisierte TM-Nanopartikel (ER27) mit Pol 188-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen 1+19 [Nanopartikel+Pol-Lösung] verdünnt, sodass je ein Lipidgehalt von 1 % resultierte. Für die Quantifizierung des Pol 188-Gehalts in der wässrigen Phase wurde diese von den Emulsionstropfen mittels Vivaspins® (6 ml, MWCO 300 kDa, Sartorius, Göttingen, Deutschland) in vier Minuten bei 4000 rpm in einer Allegra 64R Zentrifuge (Rotor C0650; Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) abzentrifugiert. Das aufgefangene Filtrat wurde anschließend am Refraktometer vermessen und die Menge an Emulgator anhand einer zuvor erstellten Pol 188-Kalibriergerade ermittelt.

Vor Beginn der Filtrationsversuche wurde jedes Vivaspin®-Vial mit bidestilliertem Wasser jeweils dreimal zentrifugiert, um den Brechungsindex beeinflussende Produktionsreste auszuspülen. Anschließend wurden die Vials für 30 Sekunden bei 2000 rpm trocken filtriert. Eventuelle wässrige Rückstände wurden vor der Probeneingabe entfernt.

3.2.1.5 Einfluss der Glycerol-Konzentration auf die Kristallisationstemperatur

Um den Einfluss der Glycerol-Konzentration auf die T_{Krist} untersuchen zu können, wurden mit Pol 188-stabilisierten TM-Nanopartikel (ER07_oG) ohne Glycerol hergestellt und anschließend mit steigenden Konzentrationen Glycerol versetzt (0-50 %), zwei Stunden bei 20 °C im Klimaschrank auf einem Horizontalschüttler (ELMI Sky Line Analog Orbital Shaker S-3.02L, ELMI Ltd., Riga, Lettland) bei 300 rpm inkubiert und anschließend mittels DSC kristallisiert. Die Partikelgröße aller Proben wurde mittels PCS vermessen.

3.2.2 Charakterisierungsmethoden

3.2.2.1 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Die Partikelgröße der Dispersionen wurde mit dem ZetaSizer Nano Series ZS (ZEN3600, Malvern Instruments) unter 173 ° Rückstreuung bestimmt. Vor der Messung wurden die Proben mit Reinstwasser bis zu einer Laserabschwächung von 6-7 verdünnt. Es erfolgten vier aufeinanderfolgende Messungen von jeweils 300 Sekunden bei 25 °C. Um die Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung zu beschreiben, wurden die Ergebnisse der letzten drei Messungen gemittelt und der z-Average-Durchmesser (z-Av.) sowie der Polydispersitätsindex (PdI) angegeben.

3.2.2.2 Polarisationslichtmikroskopie

Die direkt bei der Herstellung beladenen TM-Dispersionen wurden unter dem Polarisationslichtmikroskop (Leica DMLM Mikroskop, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) bei 100-200facher Vergrößerung auf Wirkstoffkristalle hin untersucht.

3.2.2.3 UV-Spektroskopie

Die Quantifizierung einiger Wirkstoffe erfolgte mit einem Einstrahl-Photometer (Specord 40, Analytik Jena AG, Jena, Deutschland). Dafür wurden 50-100 µl der beladenen Dispersionen in 10 ml eines Gemisches aus Tetrahydrofuran/Acetonitril [80:20] gelöst und mit einer Quarzküvette (halbmikro, Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei entsprechender Wellenlänge (Tabelle 3-6) vermessen. Die Proben wurden je zweimal aufbereitet, jede Lösung dreifach vermessen und der Mittelwert für die Auswertung verwendet. Die gemessene Absorption wurde um die Background-Absorption der gelösten unbeladenen Nanoemulsionen bei den jeweiligen Wellenlängen und in der entsprechenden Verdünnung korrigiert. Für die Ermittlung der Wirkstoffkonzentrationen wurden Kalibriergeraden der Substanzen im angegebenen Lösemittel erstellt.

3.2.2.4 Protonen-Kernspinresonanzspektroskopie (¹H-NMR-Spektroskopie)

Die ¹H-NMR wurde zur Quantifizierung von TM und Pol 188 in einigen ausgewählten Dispersionen zur Untersuchung der Emulgatorkonzentration an der Grenzfläche verwendet. Diese Methode wurde in Anlehnung an die Monographie der Poloxamere des Europäischen Arzneibuches entwickelt und erfordert keine chromatographische Trennung der Bestandteile [4,125]. Zur Probenvorbereitung wurden je nach enthaltenem Poloxamer-Gehalt 250-1000 µl Probe unter einem Stickstoffstrom für ca. zwei Stunden eingetrocknet. Anschließend wurde der erhaltene Rückstand in 1000 µl einer Mischung aus d-Chloroform und d₄-Methanol gelöst.

Tabelle 3-6: Wellenlängen für die Quantifizierung der untersuchten Wirkstoffe mittels UV-Spektrometrie.

Substanz	Wellenlänge λ
Fenofibrat	288 nm
Tocopherolacetat	286 nm
Ubidecarenon	275 nm
Betamethasonvalerat	287 nm
Orlistat	210 nm

Diese enthielt zusätzlich 50 mg/ml Benzoesäure als internen Standard für die quantitative Analyse. Zur Kalibrierung der chemischen Verschiebung wurde Tetramethylsilan (TMS) verwendet. Die vorbereiteten Lösungen wurden anschließend im ^1H -NMR (Avance DRX-400, Bruker Biospin, Rheinstätten, Deutschland) in 64 Scans mit einer Erfassungszeit von vier Sekunden und einer Relaxationsverzögerung von einer Sekunde untersucht.

Für die quantitative Analyse wurden die Integrale der folgenden Peaks herangezogen: 8,05 ppm für Benzoesäure (interner Standard) 3,66 ppm für Pol 188 und 1,30 ppm für TM. ^1H -NMR-Messungen der Lösungen von den reinen Komponenten gewährleisteten eine korrekte Zuordnung der Signale in den Spektren.

Der Gehalt von Pol 188 und TM in den jeweiligen Proben wurde basierend auf der folgenden Gleichung berechnet:

$$m_{\text{Probe}} = m_{\text{IS}} \cdot \frac{M_{\text{Probe}}}{M_{\text{IS}}} \cdot \frac{I_{\text{Probe}}}{I_{\text{IS}}} \cdot \frac{N_{\text{IS}}}{N_{\text{Probe}}} \quad [\text{Gleichung 1}]$$

Wobei m die Masse, M die molare Masse, I das Peak-Integral und N die Anzahl der äquivalenten Kerne des internen Standards, des TMs oder des Pols 188 darstellt. Die molare Masse (8655 g/mol) und der Gewichtsprozentsatz der Oxyethyleinheiten (80,5 %) des Pols 188 wurden aus dem Analysezertifikat des Herstellers entnommen, um N zu berechnen. Vorversuche mit dieser Methode ergaben eine Wiederfindungsrate für Pol 188 von 101,7 % mit einer relativen Standardabweichung von 0,84 % ($n=3$) [125]. Die detaillierte Beschreibung eines Spektrums befindet sich im Anhang (A2).

3.2.2.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Bei einigen ausgesuchten Kontrollproben wurde der TM-Gehalt mittels HPLC quantifiziert. Das System bestand aus einer 515 Pumpe, einem UV-Detektor (486 tunable absorbance detector, beide Waters Corporation, Milford, USA) und einem Midas Autosampler (Sparks, Emmen, Niederlande). Die mobile Phase, bestehend aus THF/ACN 45/55 (V/V), wurde mit einer Flussrate von 1,5 ml/min durch die zuvor auf 25 °C temperierte Säule (LiChrospher100, 250 mm x 4 mm I.D., 5µm) gepumpt. Die Detektionswellenlänge betrug 234 nm. Die Proben wurden zur Vorbereitung in THF/ACN 50/50 (V/V) gelöst und verdünnt. Jede Probe wurde zweimal aufbereitet und jeweils doppelt injiziert, wobei der TM-Gehalt anschließend mit Hilfe einer zuvor erstellten Kalibrierkurve ermittelt wurden. Die erhaltenen Ergebnisse lagen stets in einem Bereich von 9,0-10,1 % Fettgehalt. Der TM-Gehalt der Proben, die in den Freisetzungsuntersuchungen eingesetzt wurden, wurde nicht mittels HPLC bestimmt, sondern wurde lediglich über den Vergleich der mittels DSC erhaltenen endothermen Peaks der Proben

mit den Peaks von zuvor quantifizierten Dispersionen theoretisch ermittelt. Durch diesen Vergleich konnten Auffälligkeiten und Abweichungen im Fettgehalt erkannt bzw. ausgeschlossen werden.

3.2.2.6 Messungen mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie

Die Untersuchungen mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (*Differential Scanning Calorimetry*; DSC) wurden mit einem Mettler Toledo DSC 1 STAR^e System (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) mit einem FR5 Sensor durchgeführt. Das Gerät wurde mit Zink und Indium justiert und zusätzlich täglich vor Beginn der Probenmessungen mit Indium kalibriert. Es wurden je 20 µl der entsprechenden Proben in einen 40 µl Standard-Aluminiumtiegel (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) pipettiert, gewogen (Waage: XS3DU, Mettler Toledo, Gießen Deutschland) und anschließend kalt verschweißt. Die Aufnahme der Heiz- und Kühlkurven erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 2,5 K/min. Bei reinen Kristallisationsmessungen wurden die Proben von 25 °C auf 0 °C abgekühlt. Zur vollständigen Aufnahme eines Thermogramms wurden die Proben zunächst von 25 °C auf 85 °C aufgeheizt und anschließend auf -5 °C abgekühlt. Während der Messung wurden der Proben-Tiegel und der leere Referenz-Tiegel stets von einem Stickstoffstrom umspült.

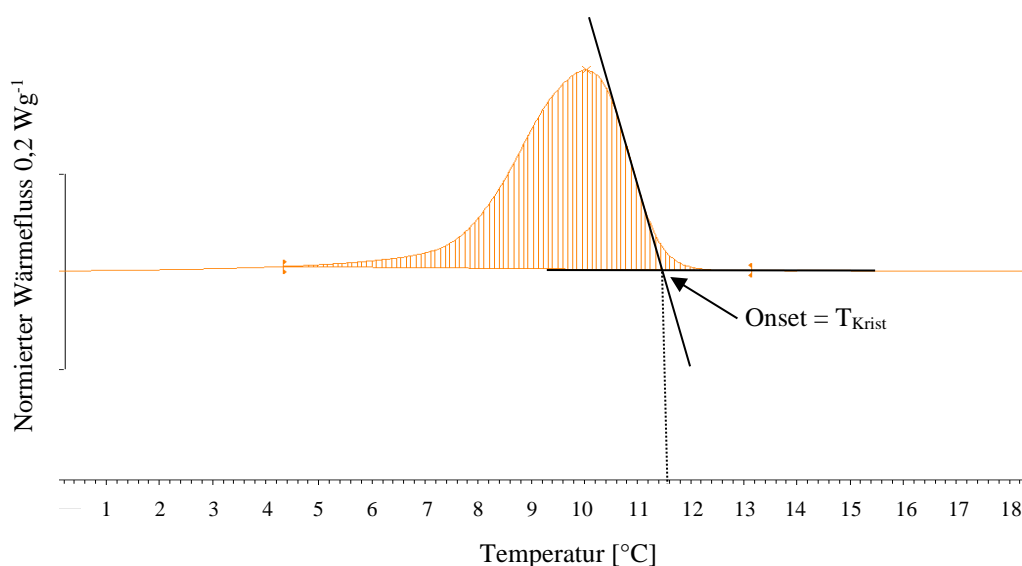


Abbildung 3-3: Kristallisationspeak einer Trimyristin-Dispersion mit Ermittlung von $T_{\text{Krist}}/\text{Onset}$, aufgenommen mittels DSC bei einer Kühlrate von 2,5 K/min.

Tabelle 3-7: *Eingesetzte Wirkstoffkonzentrationen zur Beurteilung der Beladungsmenge mittels T_{Krist} .*

Wirkstoff	Konzentration [%] bezogen auf Lipidgehalt								
Fenofibrat	0,4	0,9	1,0	1,1	1,7	1,8	2,3	2,7	3,2
Orlistat	2,0	3,0	4,0	8,0	10,0				
Tocopherolacetat	5,7	6,0	16,6	16,7					
Ubidecarenon	5,0	6,1	20,7						

Die Auswertung der Messkurven erfolgte mit der STAR^e Software (Version 10.00, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland). Als entscheidende Messgröße wurde, nach Normierung der Kurven auf das Probengewicht, die T_{Krist} der TM-Nanopartikel bestimmt: dazu wird im steilsten Anstieg des Kristallisationspeaks eine Tangente angelegt und ihr Schnittpunkt mit der Basislinie ausgewertet (Abbildung 3-3). Die erhaltene Temperatur stellt die T_{Krist} dar und entspricht der Onset-Temperatur, wobei diese Begriffe synonym verwendet werden.

3.2.3 Wirkstofffreisetzungsuntersuchungen mittels DSC

3.2.3.1 Einfluss der Beladungsmenge auf die Kristallisationstemperatur

Um den Einfluss der Beladungsmenge auf die T_{Krist} zu untersuchen, wurden TM-Nanopartikel während der Herstellung mit unterschiedlichen Konzentrationen (Tabelle 3-7) des jeweiligen Wirkstoffs beladen. Die Änderung der T_{Krist} abhängig von der Beladungsmenge wurde mittels DSC bestimmt. Hierfür wurden die TM-Nanopartikel von 25 °C auf 0 °C mit einer Kühlrate von 2,5 K/min abgekühlt.

3.2.3.2 Transferexperimente

In den Transferexperimenten wurden die wirkstoffbeladenen TM-Donorpartikel mit den entsprechenden Akzeptorsystemen in 1,5 ml HPLC-Schraubdeckelgefäßen in den Verhältnissen 1+9 und 1+99 [Donor+Akzeptor] vermischt. Die jeweilige Ansatzgröße betrug 1 ml. Als Akzeptorsysteme wurden Rapsöl-Nanoemulsion, Schweineserum und Schweineblut verwendet. Die so vorbereiteten Proben wurden bei Raumtemperatur inkubiert und dabei auf einem Horizontalschüttler (ELMI Sky Line Analog Orbital Shaker S-3.02L, ELMI Ltd., Riga, Lettland) bei 200 rpm bewegt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde mittels einer Eppendorf-Research Pipette (10-100 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) je 20 µl Probe direkt aus den Transfergefäßen gezogen, in einem Tiegel eingewogen und in der DSC vermessen. Abbildung 3-4 stellt schematisch das Prinzip der Freisetzungsuntersuchungen dar.

Unter den gewählten Messbedingungen kristallisierten nur die TM-Nanopartikel aus, während die Bestandteile der verwendeten Akzeptorsysteme (Rapsöl-Nanoemulsion, Schweineserum und Schweineblut) keinen Phasenübergang zeigten, wie durch Kontrollmessungen bestätigt wurde.

Unbeladene TM-Nanopartikel wurden bei jedem Experiment als Kontrolle mitgeführt, um mögliche Veränderungen der T_{Krist} unabhängig vom Wirkstofftransfer zu identifizieren. Sie wurden im gleichen Verhältnis mit dem entsprechenden Akzeptormedium verdünnt und zu den gleichen Zeitpunkten mit derselben Methode in der DSC vermessen. Da die Kontrollpartikel unter den gleichen Bedingungen und annähernd in der gleichen Partikelgröße wie die beladenen Donorpartikel hergestellt wurden, konnte die T_{Krist} dieser Kontrollpartikel auch als T_{Krist} für die eigentlich zu untersuchenden Partikel nach kompletter Wirkstofffreisetzung angenommen werden. Die „wahre“ T_{Krist} der entladenen TM-Nanopartikel konnte nicht direkt erfasst werden, weil die Beladung der Partikel mit den zu untersuchenden Wirkstoffen unmittelbar bei der Herstellung erfolgte.

Für die einzelnen Wirkstoffe wurden mehrere Freisetzungsexperimente durchgeführt, die im Folgenden als „n= Anzahl an unabhängigen Transferstudien“ angezeigt werden. Der Wirkstofftransfer aus den Donorpartikeln hin zu den lipophilen Akzeptoren wurde über die Änderung der T_{Krist} der TM-Nanopartikel ermittelt, deren Korrelation zuvor aufgestellt wurde (Kapitel 3.3.2). Die Ergebnisse der Freisetzungsexperimente wurden als Anteil an freigesetztem Wirkstoff (bezogen auf 100 % Freisetzung) gegen die Inkubationszeit dargestellt.

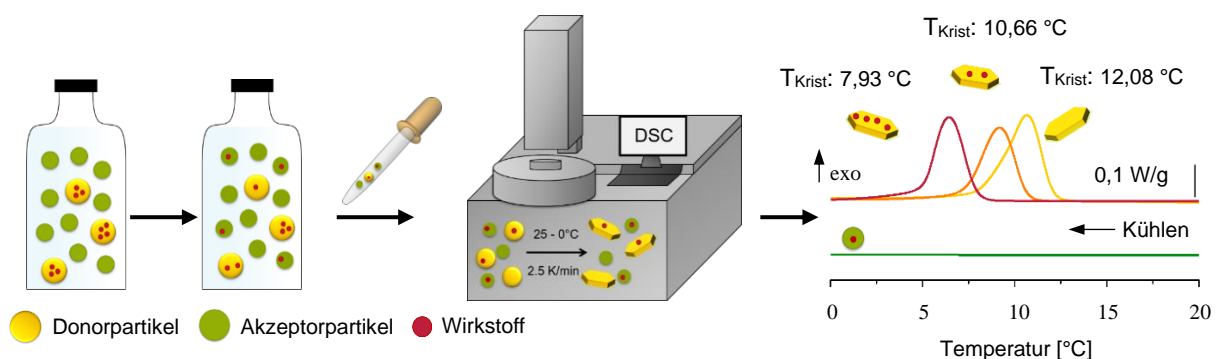


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung des Prinzips der neu entwickelten DSC-Methode für Transferuntersuchungen.

3.2.4 Entwicklung der Freisetzungsuntersuchung mittels DSC

3.2.4.1 Reproduzierbarkeitsmessungen

Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieser Methode ist die reproduzierbare Messung der T_{Krist} der Donorpartikel im entsprechenden Akzeptormedium. Dazu wurden sechsmal je 20 μl der gleichen unbeladenen TM-Nanoemulsion (ER05) eingewogen und in der DSC von 25 °C auf 0 °C mit einer Kühlrate von 2,5 K/min kristallisiert. Die T_{Krist} wurden anschließend miteinander verglichen.

3.2.4.2 Maximal mögliche Verdünnung der Donorpartikel

Es wurde die maximal mögliche Verdünnung der TM-Donorpartikel (ER05) im Akzeptormedium bestimmt, die mit der DSC noch reproduzierbar ausgewertet werden konnte. Dazu wurden unbeladene mit Pol 188-stabilisierte TM-Nanopartikel in folgenden Mischungsverhältnissen mit bidestilliertem Wasser verdünnt: 1+1, 1+2, 1+9, 1+49, 1+99, 1+199, 1+299 [TM-Partikel+Wasser], kurz durch Auf- und Ablassen mit der Pipette vermischt und anschließend direkt in der DSC unter den zuvor beschriebenen Bedingungen kristallisiert.

3.2.4.3 Optimierung der Messbedingungen – Untersuchungen zur Zeitauflösung

Um in den Untersuchungen zur Wirkstofffreisetzung eine möglichst gute Zeitauflösung zu erreichen, wurden verschiedene Messprogramme mit unterschiedlichen Start- und Endtemperaturen und verschiedenen Kühlgeschwindigkeiten (10 K/min, 5 K/min, 2,5 K/min) ausprobiert. Dazu wurde eine unbeladene TM-Dispersion (ER05) je fünfmal mit den unterschiedlichen Messprogrammen kristallisiert und die Ergebnisse im Hinblick auf Reproduzierbarkeit verglichen.

3.2.4.4 Einfluss der Verdünnung mit Akzeptormedien auf die Kristallisationstemperatur

Da die Änderung der T_{Krist} die entscheidende Messgröße zur Ermittlung des Wirkstofftransfers aus den TM-Nanopartikeln darstellt, musste die Reproduzierbarkeit der Kristallisationsmessungen in den verschiedenen Akzeptormedien bestimmt werden, um mögliche Messfluktuationen im Vergleich zu Änderungen durch Wirkstofftransfer beurteilen zu können. Dazu wurden unbeladene TM-Nanopartikel (ER24) 1+9 und 1+99 [Donor+Akzeptor] mit den Akzeptormedien (Rapsöl-Nanoemulsion, Schweineserum, Schweineblut) gemischt. Die Proben wurden je dreimal vorbereitet und jeder Ansatz anschließend dreimal in der DSC von 25 °C bis 0 °C mit einer Geschwindigkeit von 2,5 K/min kristallisiert.

3.2.4.5 Entwicklung eines Akzeptorsystems - Emulsionen aus vegetabilen Ölen

Für die Weiterentwicklung eines einfachen Akzeptorsystems wurden Nanoemulsionen aus verschiedenen raffinierten Ölen (Erdnuss-, Sonnenblumen-, Raps-, Mais-, Soja-, Mandel-, Sesamöl) unter den in Kapitel 3.2.1.2 beschriebenen Bedingungen (mit Pol 188 stabilisiert) hergestellt. Zusätzlich wurden unbeladene TM-Nanopartikel (ER09M) hergestellt. Die Partikelgrößen wurden mittels PCS bestimmt. Anschließend erfolgte die Einstellung des Pol-Gehalts der Wasserphase aller Dispersionen auf 1,5 % mittels Dialyse (in einem Gesamtansatz von je 1 l Dialysemedium bei einer Probenmenge von 5 ml) innerhalb von fünf Tagen mit einem Mediumwechsel nach drei Tagen. Die dialysierten Akzeptorsysteme wurden 1+1 mit den dialysierten TM-Dispersionen vermischt, über 140 Stunden jeweils bei Raumtemperatur und bei 37 °C inkubiert und die T_{Krist} in der DSC (25-0 °C, 2,5 K/min) ermittelt.

3.2.4.6 Physiologische Akzeptorsysteme - Stabilitätsuntersuchungen

Für Stabilitätsuntersuchungen in den verwendeten physiologischen Medien (Schweineblut und Schweineserum) wurden unbeladene TM-Nanopartikel (ER16_P188, ER16_P407) mit den Akzeptormedien je 1+9 und 1+99 in einem HPLC-Vial vermischt (Ansatzvolumen 1 ml) und jeweils bei 25 °C und bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Zuvor wurde das eingefrorene Schweineserum schonend im lauwarmen Wasser aufgetaut, während frisches Schweineblut (maximal 24 Stunden nach der Schlachtung) aus dem Kühlschrank auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Analog zu den Freisetzungsuntersuchungen wurden zu definierten Zeitpunkten Proben gezogen und in der DSC von 25 °C auf 0 °C mit einer Geschwindigkeit von 2,5 K/min kristallisiert. Zusätzlich erfolgte von jeder Probe eine Partikelgrößenbestimmung mittels PCS unter den in Kapitel 3.2.3.1 beschriebenen Bedingungen.

3.2.4.7 Physiologische Akzeptorsysteme - Lipase-Blockierung mittels alli®

Im Hinblick auf eine zeitliche Verlängerung der Freisetzungsstudien sollte untersucht werden, ob sich ein möglicher Abbau der Trägerpartikel durch einen Lipaseinhibitor verhindern, beziehungsweise verzögern lässt. Hierfür wurde das Fertigpräparat alli® mit dem Wirkstoff Orlistat aus der Apotheke verwendet. Es handelte sich um Kautabletten mit einem Wirkstoffgehalt von je 27 mg Orlistat. Das Fertigarzneimittel wurde gemörsert und in verschiedenen Konzentrationen einer Mischung aus TM-Nanopartikeln (ER05) und Schweineserum [1+1] zugefügt und für 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben gezogen und in der DSC von 25-0 °C abgekühlt.

Da der Wirkstoffgehalt nicht quantifiziert wurde, erfolgte die Annahme einer homogenen Wirkstoffverteilung in den gemörserten Tabletten, sodass alli® in folgenden Mengen von

0,5 mg, 1 mg, 2 mg, 5 mg, 10 mg und 20 mg Wirkstoff Orlistat bezogen auf die Dispersion (Ansatz 2 ml) zugesetzt wurden.

3.2.4.8 Physiologische Akzeptorsysteme - Simulation des Lipase-Abbaus

Um die Reaktionen in den physiologischen Medien besser nachvollziehen zu können, wurden erneut unbeladene TM-Nanopartikel (ER05) 1+9 mit Schweineserum vermischt und bei 25 °C über 24 Stunden inkubiert (vergleichbar mit Kapitel 3.2.4.6). Zusätzlich wurden 2 ml der unbeladenen TM-Nanopartikel mit 2 Tropfen einer 0,1 M Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung versetzt und ebenfalls bei 25 °C für 24 Stunden inkubiert. Die anschließende Kristallisation erfolgte von 25-0 °C in der DSC.

4 Versuchsergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Untersuchung der Wirkstofffreisetzung aus Lipidnanopartikeln unter möglichst realitätsnahen Bedingungen. Anschließend wurden TM-Nanopartikel mit verschiedenen schwer wasserlöslichen Wirkstoffen beladen und ihre Freisetzung in drei verschiedenen Akzeptormedien mit steigender Annäherung an physiologische Bedingungen mittels der auf dynamischer Differenzkalorimetrie beruhenden Methode untersucht.

4.1 Charakterisierung der verwendeten Lipidnanodispersionen

In dieser Arbeit wurden auf TM basierende Lipidnanopartikel als kolloidale Arzneistoffträgersysteme verwendet. Für die Freisetzungsuntersuchungen wurden Lipidnanodispersionen aus vegetabilen Ölen eingesetzt, die als lipophile Akzeptorsysteme fungierten. Sowohl die Donor- als auch die Akzeptorpartikel wurden jeweils durch Hochdruckhomogenisation hergestellt und die Partikelgröße sowie die Partikelgrößenverteilung mittels PCS bestimmt. Es konnten Nanoemulsionen reproduzierbar hergestellt werden, die abhängig vom eingesetzten Homogenisierdruck und der Zyklenzahl eine mittlere Partikelgröße (z-Av.) zwischen 80 nm und 155 nm aufwiesen. Der entsprechende PDI lag dabei jeweils zwischen 0,08 und 0,12. Genaue Angaben zu der Zusammensetzung und den Partikelgrößen der entsprechenden Proben befinden sich im Anhang (A1) unter der jeweiligen Chargenbezeichnung.

4.2 Untersuchung des Wirkstofftransfers mittels DSC

Eine noch unzureichende Darstellung der physiologischen Bedingungen am Applikationsort von kolloidalen Trägerpartikeln in vielen *in vitro*-Freisetzungsstudien erfordert die Neu- und Weiterentwicklung von geeigneten Methoden. So ist besonders wichtig, dass der Wirkstofftransfer unter möglichst realitätsnahen Bedingungen untersucht werden kann. Die Basis für die Entwicklung einer neuen Methode im Zuge dieser Arbeit stellten die Eigenschaften des verwendeten Trägersystems aus dem Triglycerid TM dar: das als Bulkmaterial feste TM bildet unter bestimmten Umständen im kolloidalen Zustand langzeitstabile flüssige Tropfen aus, sodass als Trägersystem eine Emulsion unterkühlter Schmelze entsteht [37,49]. Durch die geringe Partikelgröße der Emulsionströpfchen sinkt die T_{Krist} etwa um 20 °C unter die des Bulkmaterials, wodurch das TM auch bei Raumtemperatur in einem flüssigen Zustand verbleibt. Erst beim Abkühlen des Systems auf unter ca. 15 °C

kristallisieren die TM-Emulsionströpfchen aus und es entsteht eine Nanosuspension. Dieser Phasenübergang lässt sich mittels DSC durch Bestimmung der T_{Krist} genauer betrachten. Vorherige Studien konnten einen linearen Zusammenhang der T_{Krist} von Triglycerid-Partikeln mit einer Wirkstoffbeladung feststellen [6,71]. Auf Grundlage dieser Beobachtungen sollte eine neue Methode für Freisetzungsuntersuchungen entwickelt werden, die eine Bestimmung der freigesetzten Wirkstoffmenge über die Änderung der T_{Krist} von TM-Nanopartikeln ermöglicht. Die DSC wird unter anderem zur Bestimmung von physikalischen Zuständen, Zersetzungsprozessen oder Phasenübergängen eingesetzt und ist eher nicht auf Hochpräzisionsmessungen ausgelegt. Daher waren für die Entwicklung dieser Methode zahlreiche Voruntersuchungen notwendig, um die Möglichkeiten, Grenzen und Schwankungen der Messmethode zu eruieren.

4.2.1 Methodenentwicklung mit Poloxamer 188-stabilisierten Systemen

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden, sofern nicht anders angegeben, Pol 188 (5 %)-stabilisierte TM-Nanopartikel aus unterschiedlichen Herstellungsladungen verwendet. Die Partikelgrößen lagen zwischen 80-150 nm mit einem PdI von stets unter 0,13. Pol 188 wurde aufgrund seiner sehr niedrigen Toxizität als Emulgator ausgewählt: Es ist zur parenteralen Applikation zugelassen [126] und findet in Arzneistoffzubereitungen zur intravenösen Gabe vielfältige Verwendung. Zusätzlich weist Pol 188 eine relativ hohe kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) auf. Bei einer Konzentration von 5 % (w/v) des ungebundenen Emulgators liegt die kritische Mizellbildungstemperatur (CMT) bei 40 °C und selbst bei einer Konzentration von 10 % (w/v) noch bei 33 °C [105]. Für die hergestellten Dispersionen wurden insgesamt 5 % Pol 188 eingesetzt, wovon ein Großteil an den Partikeln gebunden vorliegt [125]. Daher kann man bei Raumtemperatur mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass in den betreffenden Systemen keine Mizellen vorhanden waren und die freigesetzte Menge nicht durch Mizell-assoziierten Wirkstoff verfälscht wurde.

4.2.1.1 Reproduzierbarkeit der Messungen

Da in der zu entwickelnden Methode die T_{Krist} die entscheidende Messgröße für die Wirkstoffquantifizierung darstellt, wurde zuerst die Sensitivität der DSC im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der T_{Krist} -Messungen ermittelt. Dazu wurde sechsmal die gleiche TM-Nanoemulsion separat in DSC-Tiegel eingewogen und von 25-0 °C bei einer Kühlrate von 2,5 K/min kristallisiert. Die Ergebnisse in Abbildung 4-1 zeigen, dass die T_{Krist} reproduzierbar mit nur sehr geringen Messschwankungen in der zweiten Nachkommastelle mittels DSC bestimmt werden konnte.

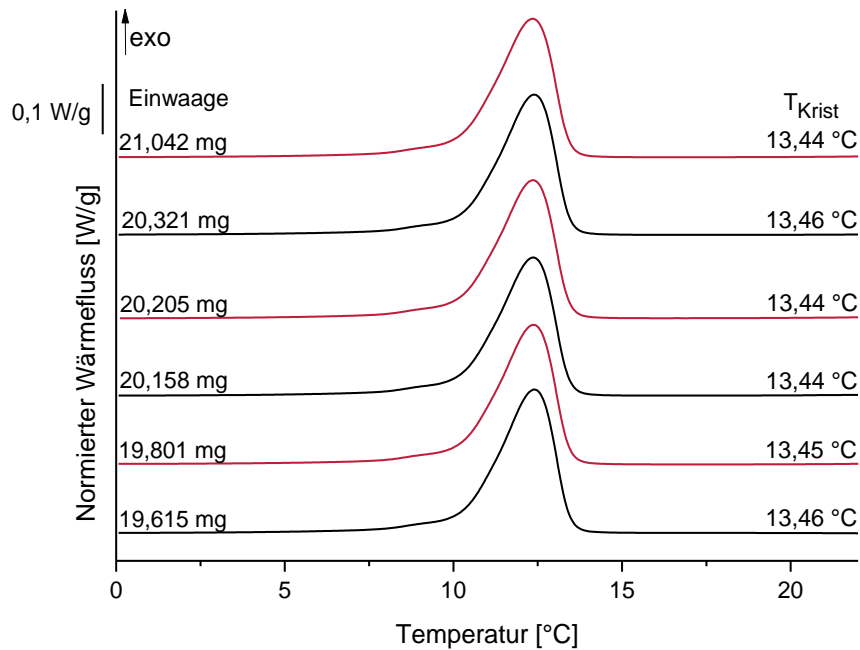


Abbildung 4-1: DSC-Kurven zur Reproduzierbarkeit der T_{Krist} -Messungen. Messbedingungen: Kühlen von 25-0 °C mit einer Kühlrate von 2,5 K/min, Probe ER05.

4.2.1.2 Korrelation von Wirkstoffbeladung und Kristallisationstemperatur

Frühere Studien haben einen linearen Zusammenhang zwischen T_{Krist} und Wirkstoffgehalt von Q10-beladenen Triglycerid-Nanopartikeln gezeigt [6]. Urška Treiber führte diese Untersuchungen in ihrer Masterarbeit weiter und belud Pol 188-stabilisierte TM-Nanoemulsionen nach der Herstellung (passiv) mit Betamethasonvalerat, Curcumin, Diazepam, Fenofibrat und Porphyrin. Ihre Ergebnisse konnten einen linearen Zusammenhang zwischen Wirkstoffkonzentration und Änderung der T_{Krist} bestätigen [71]. Dieses Phänomen sollte die Grundlage für die Entwicklung einer neuen Freisetzungsmethode bilden und wurde nochmals verifiziert. Dazu wurde zunächst FB als Modellstoff ausgewählt. Die eingesetzte Konzentration des Wirkstoffs orientierte sich an U. Treibers Untersuchungen, wobei eine möglichst hohe Beladung angestrebt wurde, damit der Unterschied der T_{Krist} von den beladenen im Vergleich zu den unbeladenen TM-Partikeln ausreichend groß ist. Allerdings musste darauf geachtet werden, dass die Beladung der Partikel unterhalb der maximalen Beladungsmenge erfolgte, sodass eine mögliche Überladung der Systeme und ein Ausfall des Wirkstoffs vermieden wurde. Die TM-Nanopartikel (ER09) wurden passiv mit steigenden Konzentrationen FB beladen, der resultierende Wirkstoffgehalt anschließend photometrisch überprüft und die T_{Krist} in der DSC ermittelt: Die Ergebnisse zeigten (Abbildung 4-2), dass sowohl die passive Beladung der Partikel mit FB erfolgreich war als auch, dass die T_{Krist} linear

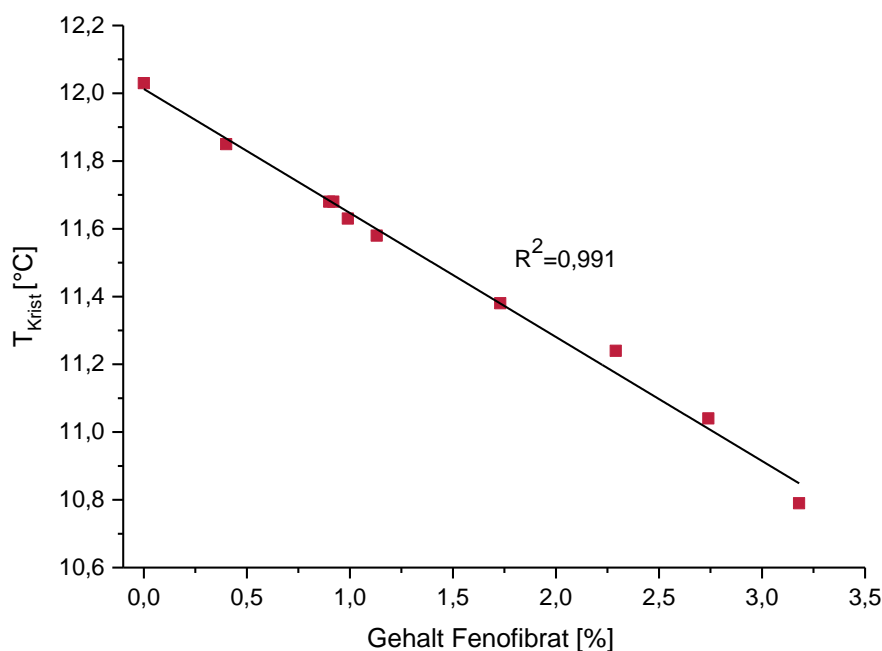


Abbildung 4-2: Korrelation der T_{Krist} mit dem Fenofibrat-Gehalt in Trimyristin-Nanopartikeln. Der Wirkstoffgehalt wurde UVmetrisch bei einer Wellenlänge von 288 nm in THF/ACN [80:20] bestimmt.

mit dem Wirkstoffgehalt korreliert: je höher der Wirkstoffgehalt in den Partikeln, desto niedriger war die resultierende T_{Krist} . Für die Freisetzungsuntersuchungen wurden dann Beladungsmengen innerhalb des linearen Bereiches, unterhalb der maximalen Beladungsmenge gewählt. Anschließend wurde untersucht, ob dieses Phänomen auch bei anderen Wirkstoffen beobachtet werden kann und somit als Grundlage für die Entwicklung einer neuen Freisetzungsmethode geeignet ist. Dazu wurden TM-Nanopartikel mit BMV (0,7 %) und OL (2 %) beladen und über 10 Tage inkubiert. Die passive Beladung war erfolgreich und konnte über die Änderung der T_{Krist} im Vergleich zu den unbeladenen Partikeln bestätigt werden (OL: 12,36 °C → 11,97 °C, BMV: 12,36 °C → 11,66 °C). Bei BMV erfolgte die Überprüfung auch über eine photometrische Quantifizierung. Da OL allerdings ein Adsorptionsmaximum bei 210 nm aufweist und in diesem Bereich auch die TM-Partikel absorbieren, konnte keine genaue Quantifizierung des Wirkstoffs mittels UV-Spektrometrie unter diesen Bedingungen durchgeführt werden.

4.2.1.3 Optimierung der Messbedingungen – Untersuchungen zur Zeitauflösung

Besonders für die Verfolgung von schnellem Wirkstofftransfer ist eine gute Zeitauflösung der Untersuchungsmethode notwendig. Da die DSC-Methode keine Separation von Donor- und Akzeptorsystem erfordert, stellte die Dauer der T_{Krist} -Messung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Diese Messdauer sollte durch Variation der Kühlrate und des

Tabelle 4-1: Reproduzierbarkeitsmessungen zur Optimierung der Messdauer durch Variation der Kühlrate und des Temperaturbereiches ($n=5$).

Kühlrate [K/min]	2,5	5	10
Messdauer	10 min	5 min	2,5 min
T_{Krist} [°C] - Mittelwert	13,13	12,79	12,23
T_{Krist} [°C] - SD	0,0180	0,0482	0,0729

gemessenen Temperaturbereichs optimiert werden. Dazu wurden unbeladene TM-Nanopartikel (ER05) je fünfmal mit verschiedenen Kühlraten in verschiedenen Temperaturprogrammen kristallisiert und die Ergebnisse im Hinblick auf Integrierbarkeit des Kristallisationspeaks und auf Reproduzierbarkeit der einzelnen Messwerte beurteilt.

Das Temperaturprogramm mit einer Starttemperatur von 25 °C und einer Endtemperatur von 0 °C erwies sich besonders gut geeignet: Es kam zu keiner Störung der thermischen Events durch den Temperatureinschwinger beim Start der Messung und der Peak wurde auch bei Unterkühlung nicht abgeschnitten. Als optimale Geschwindigkeit für die geplanten Untersuchungen erwies sich eine Kühlrate von 2,5 K/min. Sie zeigte die höchste Reproduzierbarkeit der T_{Krist} -Messungen mit der geringsten Standardabweichung (Tabelle 4-1). Messungen bei 5 K/min ergaben ebenfalls noch Standardabweichungen der Ergebnisse in einem akzeptablen Bereich und wären für Freisetzungsuntersuchungen denkbar. Bei Steigerung der Kühlrate auf 10 K/min wurden die Kristallisationspeaks allerdings sehr breit gezogen und die Messungenauigkeit stieg an. Anhand dieser Voruntersuchung wurde ein optimaler Messbereich von 25 bis 0 °C bei einer Kühlrate von 2,5 K/min für die Kristallisation der TM-Partikel für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente festgelegt. Eine einzelne Kristallisationsmessung dauert daher jeweils 10 Minuten. Als Zeitpunkt für die Betrachtung der Freisetzungskinetik wurde der Start der Messung definiert.

4.2.1.4 Einfluss der Verdünnung von Donorpartikeln und Akzeptorsystem

In den geplanten Untersuchungen sollte das TM-Donorsystem mit einem Akzeptorsystem vermischt werden, sodass ein Wirkstofftransfer erfolgt. Da unter den gewählten Messbedingungen nur das TM kristallisiert und das Peak-Integral entsprechend der Verdünnung kleiner wird, sollte die maximal mögliche Verdünnung der Donorpartikel ermittelt werden, deren T_{Krist} noch sicher auswertbar ist. Dazu wurden TM-Partikel (ER05) in

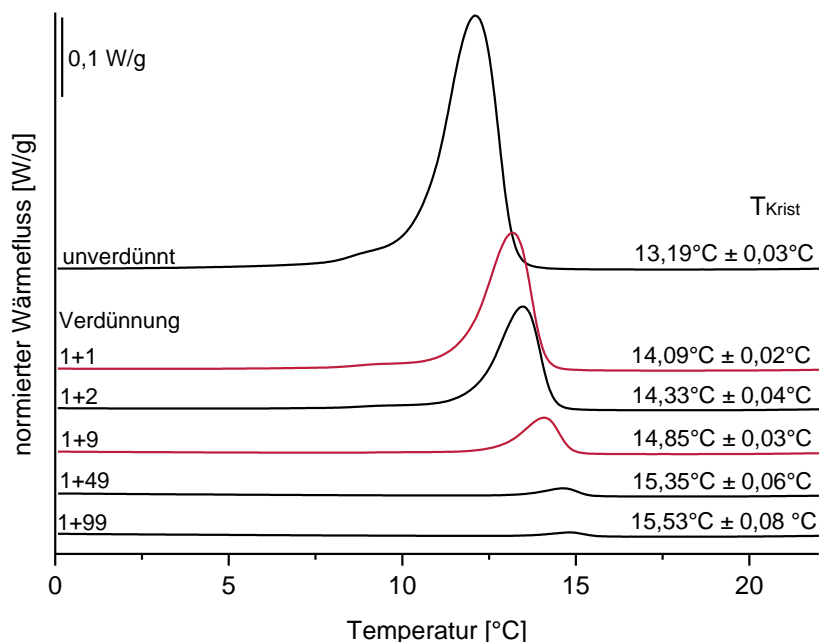


Abbildung 4-3: DSC-Kurven und entsprechende T_{Krist} von mit bidestilliertem Wasser verdünnten TM-Partikeln (ER05) [TM-Partikel+bidest. Wasser], $T_{Krist} \pm SD$ ($n=3$).

unterschiedlichen Verhältnissen mit bidestilliertem Wasser vermischt und ihre T_{Krist} mittels DSC bestimmt. Die Thermogramme zeigten eine Reduktion des Wärmestromintegrals entsprechend der eingesetzten Verdünnung (Abbildung 4-3). Je kleiner der Peak wurde, desto schwieriger wurde die Auswertung der T_{Krist} und desto größere Schwankungen wurden bei den Werten der T_{Krist} beobachtet. Es konnte ein maximal mögliches Mischungsverhältnis von 1+99 (Donor + Akzeptor) ermittelt werden. Bei höheren Verdünnungen von 1+199 und 1+299 wurde das Kristallisationsereignis vom TM zu klein, um noch genau genug ausgewertet zu werden. Zusätzlich fiel bei diesen Voruntersuchungen auf, dass die Verdünnung der TM-Partikel einen signifikanten Einfluss auf die T_{Krist} hat: Mit steigender Verdünnung verschob sich der Kristallisationspunkt immer weiter zu höheren Temperaturen. Dieses Phänomen resultierte nicht aus einer Änderung der Partikelgröße, die mittels PCS für alle Verdünnungen vor und nach der Kristallisation untersucht wurde und unverändert blieb. Vielmehr schien die Veränderung der T_{Krist} aus einer Änderung der Partikelzusammensetzung zu resultieren, vergleichbar mit der Beladung bzw. Freisetzung von Wirkstoffen.

Da Pol 188 stets in Konzentrationen unterhalb seiner CMC vorlag, wurde vermutet, dass sich die Monomeren-Konzentration des Emulgators in der wässrigen Phase abhängig von der Verdünnung verändert hat. Infolge der verringerten Emulgator-Konzentration in der Wasserphase nach der Verdünnung könnten Pol-Moleküle von der Partikeloberfläche desorbiert sein, um ein neues Konzentrationsgleichgewicht zwischen Partikelgrenzfläche und

wässriger Phase auszubilden. Diese Hypothese konnte durch Ergebnisse aus Dialyse-Experimenten gestützt werden: hierbei wurden der Anteil an ungebundenem Pol 188 von TM-Partikeln (ER07) auf zwei unterschiedliche Konzentrationen (ca. 1 % und 8 %) eingestellt. Dazu wurden die TM-Partikel in einen Dialyseschlauch gegeben, der jeweils von einer entsprechend konzentrierten Pol 188-Lösung als Dialysemedium umgeben war. Entsprechend des *Cutt offs* des Dialyseschlauches konnten nur Poloxamer- und noch kleinere Moleküle die Membran passieren. Dieser Ansatz wurde solange abgedeckt bei Raumtemperatur mittels eines Magnetrührers leicht bewegt, bis es zu einer Gleichgewichtseinstellung kam. Voruntersuchungen, in denen eine rein wässrige Phase gegen eine 5 %ige Pol 188-Lösung unter denselben Bedingungen dialysiert wurde, ergaben eine Gleichgewichtseinstellung nach ca. 120 Stunden. Der Pol-Gehalt im Dialysemedium wurde über den Brechungsindex (RI) detektiert. Wichtig hierbei war nicht die Einstellung auf eine zuvor definierte Konzentration, sondern vielmehr die Ausbildung eines Konzentrationsgleichgewichts des Pol zwischen wässriger Phase der Dispersion und des Dialysemediums. Die Partikelgröße wurde zuvor und anschließend mittels PCS bestimmt und zeigte keine Veränderung durch die Dialyse. Die dialysierten TM-Partikel wurden nachfolgend jeweils mit bidestilliertem Wasser oder mit dem zuvor eingesetzten Dialysemedium verdünnt und ihre T_{Krist} in der DSC bestimmt (Abbildung 4-4). Resultierend aus der Veränderung der Emulgator-Konzentration durch die Dialyse zeigten die TM-Partikel eine Veränderung ihrer T_{Krist} : mit steigender Pol-

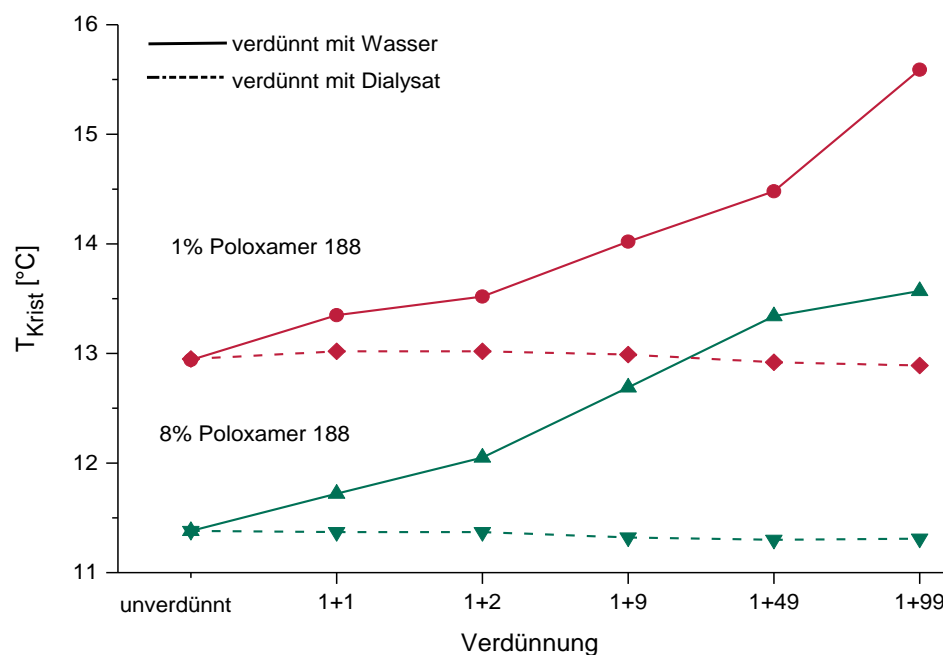


Abbildung 4-4: T_{Krist} einer TM-Nanodispersion nach Einstellung des Poloxamer 188-Gehalts mittels Dialyse auf 1 % bzw. 8 %, jeweils verdünnt mit Wasser und mit dem entsprechenden Dialysemedium.

Konzentration verschob sich die Kristallisation zu niedrigeren Temperaturen. Dies scheint vergleichbar mit der T_{Krist} -Erniedrigung infolge einer Wirkstoffbeladung. Durch die Verdünnung mit reinem Wasser erfolgte ein Ansteigen der T_{Krist} in beiden TM-Dispersionen, während durch die Verdünnung mit dem entsprechenden Dialysemedium quasi keine Änderung der T_{Krist} zu beobachten war. Es ist anzunehmen, dass durch Verdünnung mit einer Emulgatorlösung gleicher Konzentration das Pol-Gleichgewicht zwischen wässriger Phase und Partikelgrenzfläche nicht gestört wurde. Demzufolge desorbierten vermutlich keine Pol-Moleküle von der Partikelgrenzfläche, wodurch sich die Oberflächeneigenschaften der TM-Partikel nicht veränderten und die T_{Krist} unverändert blieb.

Die Beeinflussung der T_{Krist} durch die Vermischung mit Wasser bzw. möglichen Akzeptorsystemen stellte ein großes Problem für die Entwicklung der DSC-Methode dar, bei der die Quantifizierung des freigesetzten Wirkstoffs auf einer Änderung der T_{Krist} beruht. Das Problem der T_{Krist} -Verschiebung durch die Veränderung der Konzentration an Poloxamer konnte jedoch durch eine gemeinsame Dialyse von Donor- und Akzeptorsystem auf den gleichen Emulgatorgehalt gelöst werden, sodass die Entwicklung der Methode weiter vorangetrieben werden konnte. Da der zugrundeliegende Mechanismus dieser T_{Krist} -Verschiebung noch unbekannt ist und die beobachteten Phänomene wichtige Aspekte im Hinblick auf die Verwendung dieses Emulgators und allgemein zu diesen Trägersystemen aufzeigten, wurden dazu weitergehende Untersuchungen durchgeführt, die in Kapitel 4.3 dargestellt sind.

4.2.2 Akzeptorsysteme – Entwicklung und Charakterisierung

Für die Transferuntersuchungen wurde ein lipophiles Akzeptorsystem benötigt, welches die physiologische Situation am Applikationsort widerspiegelt und als Alternative für echtes Blut verwendet werden kann. Ziel war es, dieses Akzeptorsystem gezielt im Entwicklungsstadium der Freisetzungsmethode zu benutzen, um mögliche Einflüsse auf die T_{Krist} der Donorpartikel zu identifizieren und zu minimieren. Dafür sollte das gewünschte Akzeptorsystem möglichst einfach aufgebaut sein. Da die Änderung der T_{Krist} der TM-Nanopartikel die entscheidende Messgröße für die Berechnung der freigesetzten Wirkstoffmenge darstellt, gab es einige Voraussetzungen für die Zusammensetzung des Akzeptorsystems: Es sollte lipophile Komponenten enthalten, um die Transferbedingungen im Blut nachzuahmen. Außerdem durfte es weder einen Phasenübergang im gleichen Temperaturbereich wie die Donorpartikel zeigen noch deren Kristallisationsverhalten beeinflussen. Besonders geeignet dafür schienen flüssige Lipide wie vegetabile Öle und Mittelkettige Triglyceride zu sein, da sie bei Raumtemperatur

flüssig vorliegen und erst bei sehr niedrigen Temperaturen kristallisieren. Einige ausgewählte vegetabile Öle wurden zu Nanodispersionen verarbeitet und auf Anwendbarkeit als Akzeptorsystem hin untersucht.

Verwendung von raffiniertem Sojaöl

Zuerst wurde die Anwendbarkeit einer Pol 188-stabilisierten Nanoemulsion auf Sojaöl-Basis getestet. Sie wurde unter gleichen Bedingungen wie die TM-Nanoemulsion mittels Hochdruckhomogenisation hergestellt. Da Sojaöl einen Schmelzpunkt von unter -10 °C hat, liegt es bei Raumtemperatur flüssig vor. Die Nanopartikel (ER05-Soja) zeigten dementsprechend im Messbereich zwischen $25-0\text{ °C}$ keinen Phasenübergang, sodass es nicht zu einer Überlagerung der thermischen Ereignisse mit dem der TM-Donorpartikel kam. Die Partikelgröße der Sojaöl-Nanoemulsion lag mit einem z-Average von 143 nm im gleichen Größenbereich wie die der verwendeten Donorpartikel (ER07/ER08).

Als Kontrolluntersuchung wurden die unbeladenen TM-Donorpartikel mit den Sojaöl-Akzeptorpartikeln über 24 Stunden inkubiert und die T_{Krist} in der DSC vermessen. Es zeigte sich ein erheblicher Anstieg der T_{Krist} von $11,45\text{ °C}$ auf $13,11\text{ °C}$ innerhalb des Untersuchungszeitraums. Diese Änderung deutete auf eine gegenseitige Beeinflussung der Lipidsysteme hin. Die gemeinsame Einstellung der Konzentrationen an ungebundenem Pol 188 in der wässrigen Phase der beiden Systeme mittels Dialyse konnte diese Beeinflussung verhindern, sodass es zu keiner signifikanten Änderung der T_{Krist} der Donorpartikel durch Mischung mit dem Akzeptorsystem mehr kam. Die dialysierten Partikel wurden anschließend in verschiedenen Verhältnissen miteinander vermischt und die T_{Krist} in der DSC bestimmt. Die erfolgreiche Einstellung der Emulgatorkonzentration durch Dialyse konnte durch eine konstante T_{Krist} , auch in verschiedenen Mischungsverhältnissen, bestätigt werden (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: T_{Krist} von dialysierten TM-Donorpartikeln aus drei unterschiedlichen Chargen in verschiedenen Mischungsverhältnissen mit dialysierten Sojaöl-Nanopartikeln. Beide Systeme wurden gemeinsam mittels Dialyse auf je $1,5\text{ %}$ Poloxamer 188 in der Wasserphase eingestellt. Alle Partikel lagen im selben Größenbereich mit einem Partikeldurchmesser von 150 nm .

Mischungsverhältnis [Donor+Akzeptor]	$T_{\text{Krist}} [\text{ °C}]$		
	ER05	ER07	ER08
nur Donorpartikel	11,61	12,21	12,10
1+1	11,63	12,26	12,12
1+2	11,61	12,27	12,11
1+9	11,59	12,22	12,10
1+99	11,57	12,23	12,09

Mehrere Ansätze mit unterschiedlichen Chargen der TM-Partikel und der Sojaöl-Partikel wurden untersucht und zeigten, dass nach gemeinsamer Dialyse keine Verschiebung der T_{Krist} durch Verdünnung des Donorsystems mit dem Akzeptorsystem erfolgte.

Trotz einer annähernd gleichen Größe von ca. 150 nm (z-Average) unterschied sich die T_{Krist} der Partikel der ER05-Probe erheblich von den anderen beiden Proben. Hier spielte vermutlich das unterschiedliche Alter der verwendeten Sojaöle eine entscheidende Rolle: Das verwendete Sojaöl für die Akzeptorpartikel, die anschließend mit den TM-Partikeln der Probe ER05 vermischt wurden, war wesentlich älter als das Sojaöl, welches für die Akzeptorpartikel zur Vermischung mit den anderen beiden TM-Partikeln verwendet wurde. Es scheint, als wenn es schon während der Dialyse zu einer Beeinflussung der T_{Krist} der TM-Partikel gekommen ist: direkt nach der Herstellung wiesen die ER05-Partikel eine T_{Krist} von 13,44°C auf, während diese nach der Dialyse drastisch auf 11,61°C gesunken ist. Daher wurde die Langzeit-Stabilität der Donorpartikel (ER05), auch im Hinblick auf die geplanten Freisetzungsuntersuchungen, in Sojaöl-basierten Akzeptorsystemen genauer überprüft. Es wurden Sojaöle mit unterschiedlicher Lagerdauer verwendet: ein frisches und ein ca. 6 Monate altes raffiniertes Sojaöl, woraus zwei Akzeptorsysteme hergestellt wurden. Donor- und beide Akzeptor-Dispersionen wurden anschließend gemeinsam auf 1,5 % Pol 188 dialysiert und zeigten bei Vermischung keine signifikante Änderung in der T_{Krist} der TM-Nanopartikel.

Die unbeladenen TM-Partikel wurden über 116 Stunden in den beiden Sojaöl-Nanoemulsionen [Mischung 1+2] sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 37 °C inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten in der DSC vermessen. Die als Kontrolle bei jedem definierten Zeitpunkt mit vermessenen reinen TM-Partikel zeigten nur leichte Schwankungen in ihrer T_{Krist} über den Messzeitraum. Zusätzlich wurde die Partikelgröße der Mischungen vor und nach Inkubation mittels PCS bestimmt, um einen Größeneinfluss auf die Änderung der T_{Krist} auszuschließen. Die Partikel waren in jedem Ansatz stabil und wiesen keine signifikante Veränderung zur Ausgangspartikelgröße auf (z -Av.: ± 7 nm, PdI $\pm 0,06$). Dennoch musste nach Betrachtung der mittels DSC für die Mischungen erhaltenen Ergebnisse (Abbildung 4-5) die Verwendbarkeit von raffiniertem Sojaöl als Akzeptorsystem ausgeschlossen werden: Die Inkubation im Sojaöl-basierten Akzeptorsystem beeinflusste die Kristallisation der unbeladenen TM-Donorpartikel erheblich. Die T_{Krist} wurde in allen Ansätzen deutlich zu niedrigeren Temperaturen verschoben, wobei dies bei Verwendung des älteren Sojaöls und bei der höheren Inkubationstemperatur besonders ausgeprägt war. Da raffiniertes Sojaöl aus einem hohen Anteil mehrfach ungesättigter und oxidationsempfindlicher Fettsäuren (Analysezertifikat des Herstellers) besteht, wurde vermutet, dass es sich hier um eine Interaktion der TM-Partikel mit molekularen

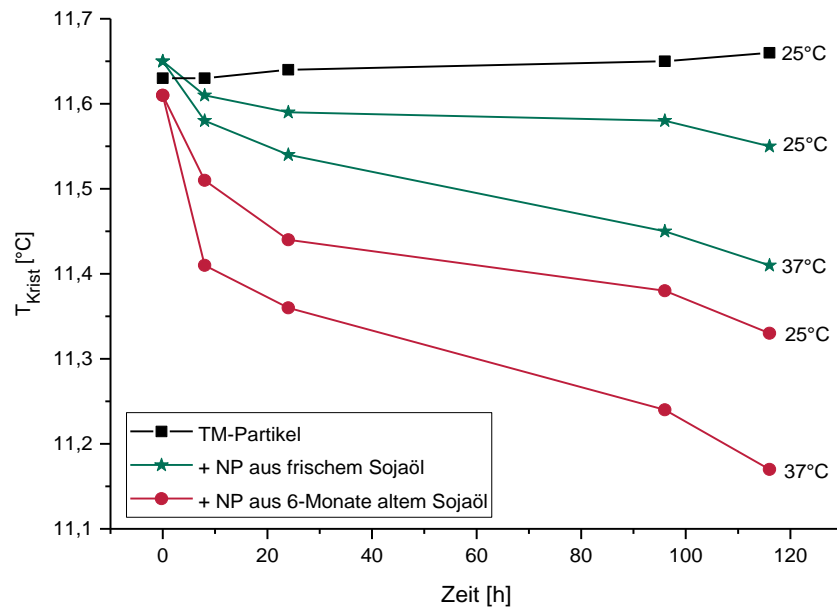


Abbildung 4-5: Kristallisationstemperaturen von unbeladenen TM-Partikeln im Verlauf der Inkubation mit zwei unterschiedlichen Sojaöl-Nanoemulsionen, die sich im Alter des verwendeten Sojaöls unterschieden. Die Inkubationen wurden bei 25 °C und bei 37 °C, die Kristallisation in der DSC von 25-0 °C bei 2,5 K/min durchgeführt.

Verunreinigungen und Oxidationsprodukten aus dem Sojaöl handeln könnte. Diese könnten durch den Einbau in die Partikel die Kristallisationseigenschaften des TMs beeinflussen und folglich zu einer Änderung der T_{Krist} führen. Diese Hypothese wird durch die verstärkte Erniedrigung der T_{Krist} durch die Verwendung von älterem Sojaöl bei höherer Inkubationstemperatur unterstützt. Das Alter und die hohen Temperaturen führten eventuell zu verstärkter Oxidation und zu vermehrter Bildung von Abbauprodukten. Außerdem ist zu bedenken, dass die Sojaöl-Nanoemulsionen zwar bei Raumtemperatur in einem nicht temperierten Hochdruckhomogenisator hergestellt wurden, sich das gesamte System aber durch den Herstellungsprozess erwärmte. Die daraus resultierenden erhöhten Temperaturen könnten schon bei der Herstellung zu Instabilitäten der ungesättigten Fettsäuren geführt haben. Zusätzlich wurde bei der Inkubationstemperatur von 37 °C ein Anstieg der Enthalpie und eine leichte Veränderung der Geometrie des Kristallisationspeaks beobachtet. Dies wurde auf mögliche Verdunstungseffekte zurückgeführt, wonach sich die Pol-Konzentration in der Formulierung veränderte und dadurch die T_{Krist} beeinflusst wurde. Die auffällig starke Abweichung der T_{Krist} der TM-Partikel im Sojaöl-Akzeptorsystem wurde also vermutlich durch eine Kombination aus Interaktion mit Abbauprodukten und Verdunstungseffekten verursacht. Die Verwendung eines mit frischem Sojaöl hergestellten Akzeptorsystems bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C könnte allerdings durchaus realisierbar sein, da hier die Veränderung der T_{Krist} wesentlich geringer ausfiel. Um das Akzeptorsystem weniger anfällig

zu machen, wurde der Einsatz von Antioxidantien im Sojaöl erwogen. Allerdings handelt es sich bei dieser Stoffgruppe meist um sehr lipophile Substanzen, sodass eine Beeinflussung der T_{Krist} relativ wahrscheinlich schien. Daher wurde dieser Lösungsansatz nicht weiter untersucht. Dennoch bieten diese Ergebnisse eine Möglichkeit zur Weiterentwicklung der vorgestellten DSC-Methode: so könnte sie zum Beispiel für Reinheits-Untersuchungen von vegetabilen Ölen weiter ausgebaut werden. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde insgesamt von der Verwendung eines auf Sojaöl-basierenden Akzeptorsystems für diese Art der Freisetzungsuntersuchungen verzichtet. Die Einflüsse auf die T_{Krist} schienen zu unkalkulierbar, besonders im Hinblick auf den noch sehr frühen Entwicklungsstatus.

Verwendung weiterer vegetabler Öle

Nachdem sich raffiniertes Sojaöl aufgrund hoher Oxidationsempfindlichkeit als Lipidmatrix für ein Akzeptorsystem als ungeeignet herausgestellt hatte, wurden andere pflanzliche Öle in pharmazeutischer Qualität auf Kompatibilität mit dem TM-System untersucht. Ihre jeweilige Fettsäurezusammensetzung ist in Abbildung 4-6 dargestellt. Als besonders kritisch für Oxidationsanfälligkeit und Instabilitäten ist der Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu betrachten. Die ausgewählten frischen Öle wurden anschließend analog der zuvor untersuchten Sojaöl-Akzeptorpartikel verarbeitet, indem jeweils 10 % Lipidmatrix mit 5 % Pol 188 bei Raumtemperatur hochdruckhomogenisiert wurden. Die entstandenen Nanoemulsionen wiesen

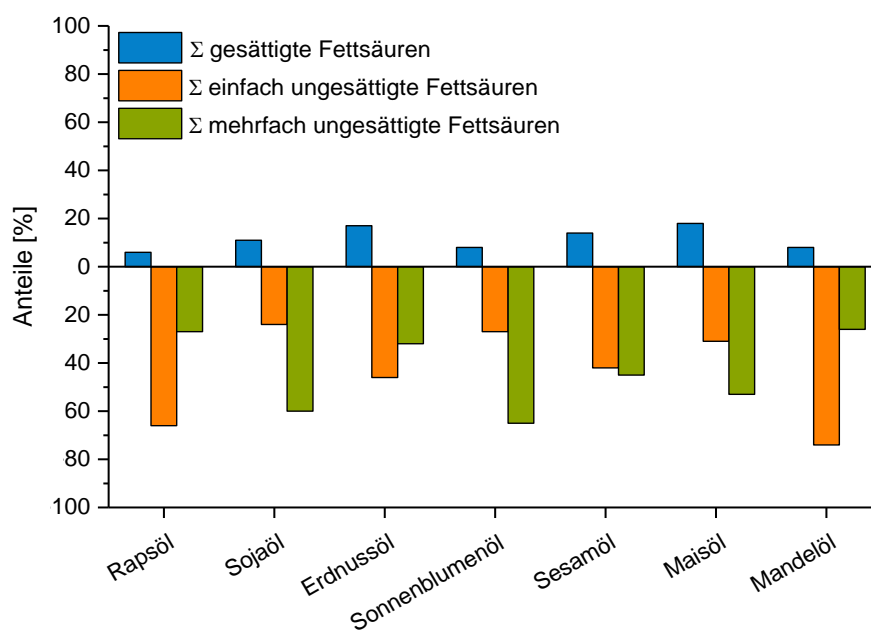


Abbildung 4-6: Fettsäurezusammensetzung der untersuchten pflanzlichen Öle für die Entwicklung eines Akzeptorsystems (Herstellerangaben).

annähernd die gleiche Partikelgröße von ca. 110 nm mit einem akzeptablen Pdl von unter 0,12 auf (Abbildung 4-7).

Alle hergestellten Akzeptorpartikel wurden mittels gemeinsamer Dialyse mit den unbeladenen TM-Donorpartikeln auf einen gleichen Gehalt von ca. 1,5 % ungebundenem Pol 188 in der wässrigen Phase eingestellt. Die Akzeptorsysteme wurden jeweils 1+1 mit dem Donorsystem gemischt und die erfolgreiche Einstellung eines Emulgatorgleichgewichts durch die Messung der $T_{K_{rist}}$ in der DSC untersucht. Die TM-Partikel zeigten in allen Akzeptorsystemen nur eine leichte Abweichung im Vergleich zur Ausgangs- $T_{K_{rist}}$. Somit konnte die Dialyse als erfolgreich betrachtet werden. Die Verwendbarkeit wurde anschließend durch eine Inkubation der TM-Partikel in den jeweiligen Akzeptorsystemen über 140 Stunden bei 37 °C in einer 1+1 Mischung getestet und im Hinblick auf $T_{K_{rist}}$ -Veränderungen beurteilt. Die Partikelgröße wurde während dieses Experiments bei jedem Probenzug mittels PCS kontrolliert und zeigte keine Veränderungen über den Versuchszeitraum. Als Kontrolle wurde die TM-Dispersion in gleicher Verdünnung mit der Pol 188-Dialyselösung mitgeführt.

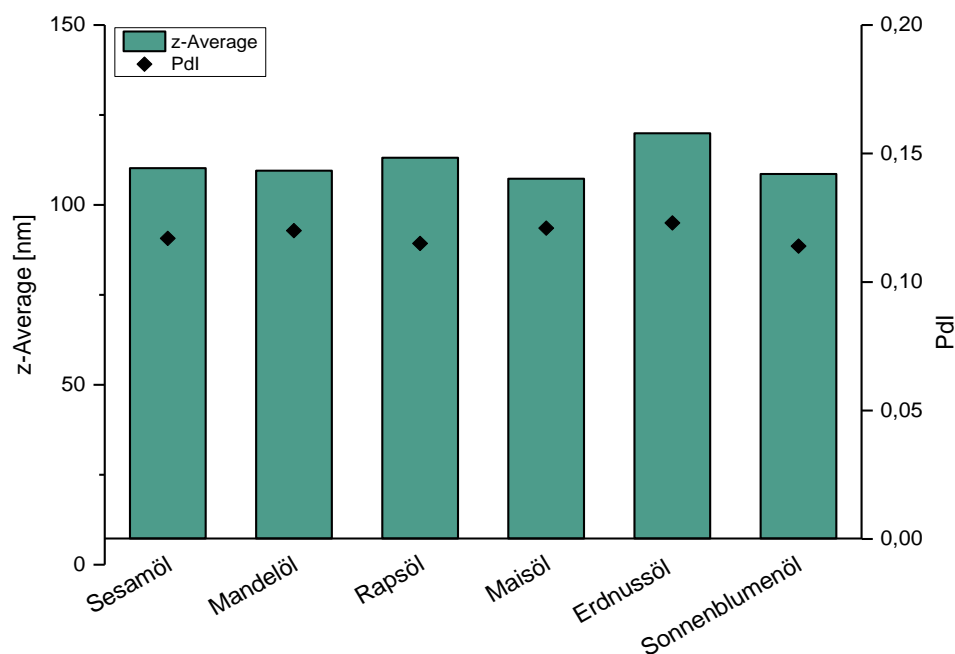


Abbildung 4-7: Partikelgröße und Pdl der aus vegetabilen Ölen hergestellten Akzeptorsystemen.

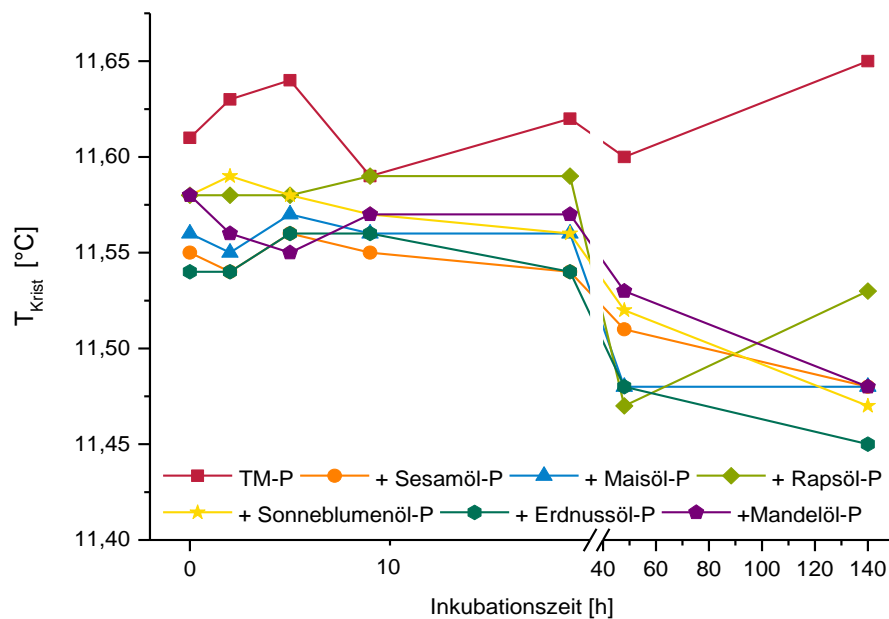


Abbildung 4-8: Kristallisationstemperatur der TM-Nanopartikel während der Inkubation in verschiedenen Akzeptorsystemen über 140 Stunden bei 37 °C. Das Mischungsverhältnis betrug 1+1. Die Kristallisation erfolgte in der DSC von 25-0 °C bei 2,5 K/min.

Abbildung 4-8 zeigt die T_{Krist} der TM-Partikel in den verschiedenen Akzeptorsystemen über die Zeit. Die Integrale der Kristallisationspeaks stiegen in allen Proben an. Da die Öle frisch verarbeitet wurden und anschließend direkt das Experiment durchgeführt wurde, konnte eine Beeinflussung der T_{Krist} durch altersbedingte Verunreinigungen ausgeschlossen werden. Vielmehr wurden diese Veränderungen auf mögliche Verdunstungseffekte zurückgeführt, da sich in allen Ansätzen Kondenswasser an den Inkubationsgefäßwänden gebildet hatte. Durch das Verdunsten von Wasser in der Probe veränderte sich die Formulierungszusammensetzung, vor allem das Verhältnis von Fett zu Emulgator. Dies hatte Auswirkungen auf die T_{Krist} , wie die Voruntersuchungen gezeigt haben. Daher ist es überaus wichtig, dass eine mögliche Verdunstung verhindert wird. Für die weitere Methodenentwicklung wurden deshalb zunächst alle Freisetzungsuntersuchungen bei 25 °C durchgeführt. Insgesamt schienen die Schwankungen der T_{Krist} wesentlich geringer auszufallen als bei der Verwendung von raffiniertem Sojaöl. Da die Rapsöl- und Sesamöl-Partikel die geringste Verschiebung der T_{Krist} während des Experiments zeigten, wurde der Versuch mit diesen beiden Systemen im gleichen Setup, allerdings bei 25 °C, wiederholt. Über 140 Stunden zeigten sich keinerlei nennenswerten Unterschiede im Kristallisationsverhalten der TM-Partikel in den Akzeptorsystemen. Nach Betrachtung der Inkubationsergebnisse und der Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Öle wurde Rapsöl für die Entwicklung eines Akzeptorsystems ausgewählt. Es führte in beiden

Inkubationsversuchen lediglich zu einer geringen Beeinflussung der T_{Krist} der TM-Partikel und weist zusätzlich durch seinen kleinen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren eine gewisse Oxidationsstabilität auf. Sojaöl enthält im Vergleich dazu einen wesentlich höheren Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, womit die erhöhte Oxidationsempfindlichkeit und die mögliche Beeinflussung der TM-Partikel durch Abbauprodukte erklärbar ist. Insgesamt wurde allerdings immer auf die Verwendung von frischen Ölen für die Herstellung der Akzeptorsysteme geachtet, da geringe molekulare Verunreinigungen, die organoleptisch noch nicht erkennbar sind, schon zu einer Veränderung der T_{Krist} der TM-Partikel führen könnten.

Um solche und weitere Einflüsse auf das Kristallisationsverhalten während der Freisetzungsuntersuchung zu identifizieren, waren umfangreiche Kontrollmessungen notwendig. Es wurden in den Freisetzungsuntersuchungen daher stets unbeladene TM-Partikel im gleichen Verhältnis mit dem gewählten Akzeptorsystem vermischt, unter den gleichen Bedingungen wie die eigentliche Probe inkubiert, vermessen und die Änderungen der T_{Krist} beurteilt.

4.2.2.1 Physiologische Akzeptorsysteme - Stabilitätsuntersuchungen

Um Freisetzungsuntersuchungen unter möglichst realistischen Bedingungen durchzuführen, sollten auch physiologische Medien wie Serum und Vollblut vom Schwein als Akzeptorsysteme verwendet werden. Da die Änderung der T_{Krist} die entscheidende Messgröße für die Berechnung der Wirkstofffreisetzung in dieser Methode darstellt, wurden zuerst Kontrollmessungen mit unbeladenen TM-Partikeln (ER05) durchgeführt, um mögliche Veränderungen im Kristallisationsverhalten durch Interaktion mit Serumbestandteilen zu identifizieren. Dazu wurde die Dispersion 1+1 mit Schweineserum vermischt, bei 25 °C über 70 Stunden inkubiert und die Partikel zu gegebenen Zeitpunkten in der DSC kristallisiert. Dieser Versuch wurde mehrfach wiederholt und zeigte jeweils vergleichbare Ergebnisse. Die Größe der TM-Partikel wurde mittels PCS nach Beendigung des Experiments überprüft und zeigte sowohl in Größe als auch in Verteilung keine signifikanten Veränderungen (0 h: 150 nm, Pdl: 0,15 / 70 h: 154 nm, Pdl: 0,16). Bei Betrachtung der Kristallisationskurven (Abbildung 4-9) fällt auf, dass sich sowohl die Peakgeometrie als auch die T_{Krist} über die Zeit erheblich veränderten. Ein sofortiger Anstieg der T_{Krist} nach Verdünnung mit Serum von 13,44 °C auf 13,89 °C wurde vermutlich durch die Ausbildung eines Emulgatorgleichgewichts und der damit verbundenen Diffusion von Pol-Molekülen von der Partikelgrenzfläche ausgelöst, wie schon

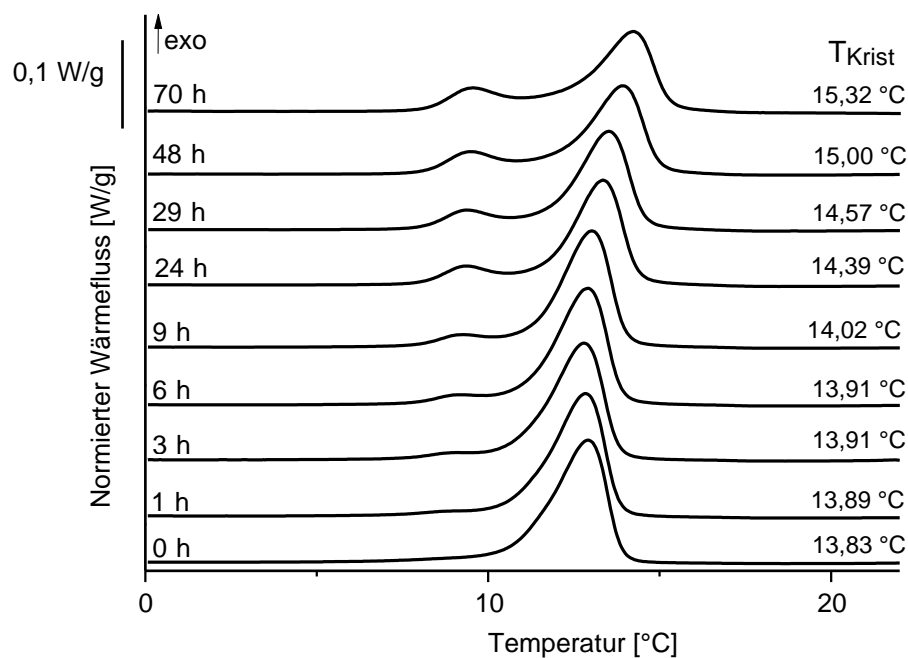


Abbildung 4-9: Untersuchungen zur Stabilität (bei Raumtemperatur) von unbeladenen, mit Pol 188-stabilisierten TM-Nanopartikeln (ER05) in Schweineserum [1+1] anhand des Kristallisationsverhalten. Die Kristallisationstemperatur der unverdünnten TM-Nanopartikel betrug 13,44 °C.

zuvor beobachtet. Da die T_{Krist} und die Peakform in den ersten sechs Stunden annähernd konstant blieb, wurden die Freisetzungsuntersuchungen innerhalb dieses Zeitraumes durchgeführt. Nach sechs Stunden Inkubationszeit wurde allerdings eine Art Spaltung des Peaks erkennbar: das Hauptintegral nahm ab und es bildete sich eine Schulter bei niedrigeren Temperaturen. Mit zunehmender Dauer wurde diese Schulter immer ausgeprägter und der Hauptpeak dementsprechend kleiner. Zusätzlich wurde die T_{Krist} zu höheren Temperaturen verschoben, wodurch eine korrekte Auswertung des Wirkstofftransfers über die Änderung der T_{Krist} in solchen Mischungen unmöglich wäre.

Das zugrundeliegende Phänomen scheint der Abbauprozess der TM-Partikel zu sein. Durch die physiologische Herkunft des Schweineserums waren folglich auch Lipoproteinlipasen im Akzeptorsystem vorhanden. Diese Enzyme katalysieren die Abbaureaktion von Triglyceriden, um sie so für den Stoffwechsel verfügbar zu machen. Die hier eingesetzten TM-Trägersysteme wurden vermutlich von den Lipasen in Monoglyceride und freie Fettsäuren abgebaut [75,127]. Da die entstehenden freien Fettsäuren grenzflächenaktiv sind [68], beeinflussten sie wahrscheinlich die Kristallisation der TM-Partikel und führten zu den oben beschriebenen Änderungen der Thermogramme. Diese Hypothese sollte mit Hilfe des nachfolgenden Experiments untermauert werden: Dazu wurde der Abbau der TM-Partikel durch Zugabe von 0,1 M NaOH-Lösung in einer Verseifungsreaktion simuliert und die Auswirkungen auf das

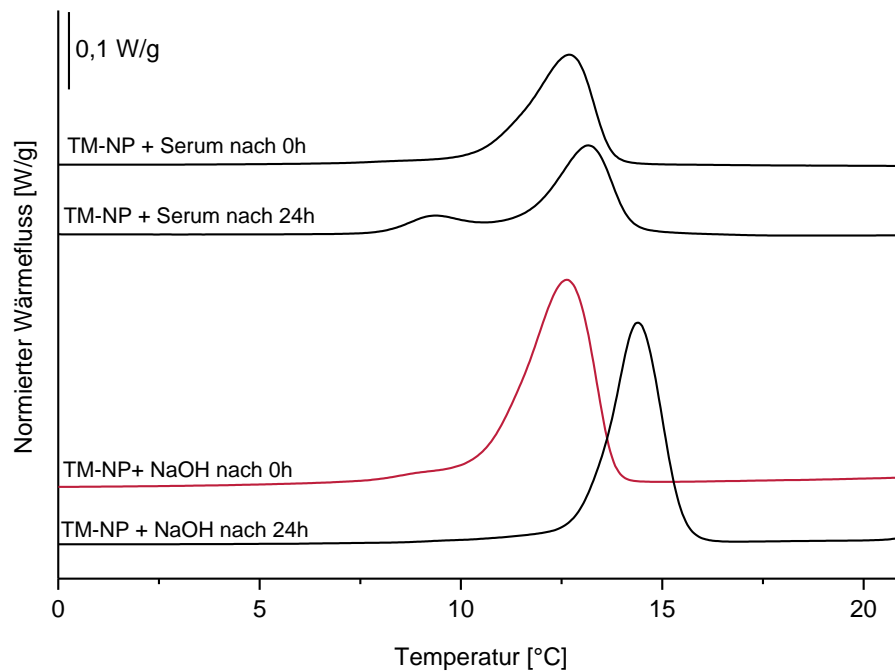


Abbildung 4-10: Thermogramme einer Trimyristin-Dispersion (TM-NP), jeweils nach Zugabe von Serum oder 0,1 M NaOH-Lösung, inkubiert über 24 Stunden.

Kristallisationsverhalten untersucht. Die Reaktion verläuft theoretisch wie folgt: Das NaOH liegt in der Lauge dissoziiert vor, die Hydroxidionen greifen die Esterbindung der Triglyceride an und es kommt zu einer Abspaltung der einzelnen Fettsäurereste. Die Ergebnisse zeigten deutlich eine Verschiebung des Kristallisationspeaks nach rechts zu höheren Temperaturen (Abbildung 4-10). Allerdings war dieses Verhalten viel stärker ausgeprägt als bei den TM-Partikeln in Serum und es fehlte die Schulter im niedrigeren Temperaturbereich. Tendenziell lassen sich diese Ergebnisse aber mit den Ergebnissen aus den Inkubationsversuchen im Serum vergleichen und deuten auf eine Abbaureaktion durch die Serumlipasen hin. Diese Beobachtungen erschwerten die Verwendung der DSC-Methode für Freisetzungsuntersuchungen erheblich, da hier zusätzlich zur Beeinflussung durch die Verdünnung mit Akzeptormedium ein weiterer Faktor die T_{Krist} der TM-Partikel unabhängig vom Wirkstofftransfer beeinflusste.

Lipase-Blockierung

Um den Zeitraum für Freisetzungsuntersuchungen in physiologischen Medien zu verlängern, wurde eine Blockierung der Serum-Lipasen durch die Zugabe eines Lipase-Inhibitors getestet. Dazu wurde das Fertigpräparat alli® mit dem Wirkstoff Orlistat ausgesucht. Bei dem verwendeten Präparat handelte es sich um Kautabletten mit einem Wirkstoffgehalt von 27 mg Orlistat pro Einheit. Orlistat wird zur Unterstützung einer Gewichtsreduktion durch spezifische und langanhaltende Hemmung von fettverdauenden Enzymen des Magen-Darm-Trakts

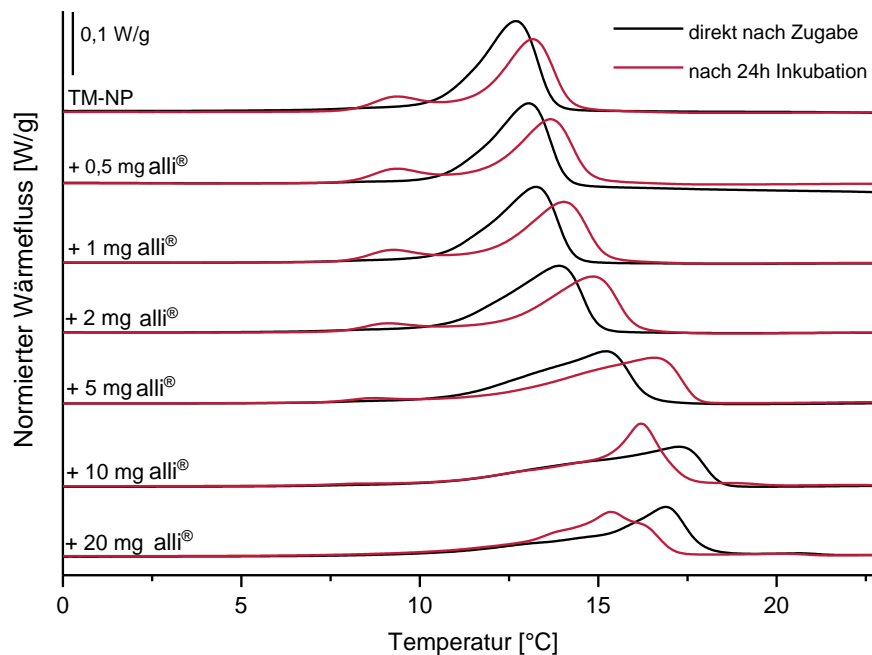


Abbildung 4-11: DSC-Kurven einer TM-Dispersion in Serum (1+1) mit steigenden alli[®]-Konzentrationen zur Lipase-Inhibierung (Menge bezogen auf Gesamt-Ansatz). Dargestellt im Vergleich direkt nach der Zugabe und nach 24 Stunden Inkubation.

angewendet. Durch die Inaktivierung der Lipasen können die Triglyceride aus den Nahrungsfetten nicht mehr in resorbierbare Fettsäuren und Monoglyceride hydrolysiert werden [128]. In diesem Versuch wurde das verwendete Schweineserum mit verschiedenen Anteilen von alli[®] versetzt, ca. 10 min inkubiert und anschließend im Verhältnis 1+1 mit den TM-Partikel (ER05) gemischt. Diese Mischung wurde direkt und nach 24 Stunden Inkubation in der DSC vermessen. Mit zunehmender alli[®]-Konzentration war die Ausbildung der Schulter zu niedrigeren Temperaturen nicht mehr so stark ausgeprägt (Abbildung 4-11). Dies könnte auf eine mögliche Blockierung der Serumlipasen und einem demzufolge geringeren Abbau der TM-Partikel hindeuten.

Allgemein stellte sich die Interpretation der Ergebnisse jedoch als schwierig heraus, denn durch die Verwendung des Fertigpräparats alli[®] wurden dem System noch weitere Hilfsstoffe (Mannit, Xylit, Laktose, Natriumstärkeglycolat, mikrokristalline Zellulose, Povidon, Glyceroldibehenat, Saccharosemonopalmitat, Natriumstearyl fumarat, Macrogolstearat) [36] zugefügt, die die Kristallisation der TM-Partikel offenbar erheblich beeinflussten. Maßgeblich dafür verantwortlich war vermutlich der grenzflächenaktive O/W-Emulgator Macrogolstearat, wobei auch die lipophilen Hilfsstoffe Glyceroldibehenat und Saccharosemonopalmitat an der Veränderung der Kristallisationseigenschaften der TM-Partikel eine Rolle gespielt haben könnten. Die Kristallisationspeaks wurden schon direkt nach Zugabe höherer Mengen von alli[®]

sehr breit und nach rechts verschoben, wodurch in einem Freisetzungsexperiment keine Auswertung der Änderung der T_{Krist} möglich wäre. Für weiterführende Untersuchungen zur Blockierung der Serumlipasen müsste der reine Inhibitor ohne zusätzliche Hilfsstoffe verwendet werden. Außerdem muss bei Verwendung des Inhibitors Orlistat berücksichtigt werden, dass dieser aufgrund seines hohen $\log P$ -Wertes von über 7 wahrscheinlich selbst in die Lipidpartikel transferiert und es demzufolge zu einer Beladung mit resultierender Erniedrigung der T_{Krist} kommen würde. Insgesamt ist die Verwendung von sehr lipophilen Lipaseinhibitoren in diesem Versuchs-Setup eher ungünstig und nicht praktikabel. Stattdessen könnten alternative Möglichkeiten zur Lipase-Blockierung wie Calcium-Komplexierung oder Hitzeinaktivierung untersucht werden. Allerdings ist zu bedenken, dass man bei der Verwendung von Lipase-inaktivierten Medien während der Freisetzungsuntersuchungen immer weiter von den realen *in vivo*-Bedingungen abrückt. Zumindest über einige Stunden sind auch ohne weitere Modifikationen Freisetzungsuntersuchungen in physiologischen Medien möglich. Anschließend werden die Partikel durch Lipasen abgebaut und der enthaltene Wirkstoff würde freigesetzt werden. Da dieses Schicksal den Trägerpartikeln aber auch im menschlichen Körper widerfährt, erfolgt so eine realistische Darstellung der *in vivo*-Bedingungen.

4.2.3 Emulgatoraustausch von Poloxamer 188 gegen Poloxamer 407

Pol 188 ist für die parenterale Applikation zugelassen [126] und liegt bei den verwendeten Messbedingungen in Konzentrationen unterhalb seiner CMC vor [105]. Daher scheint der Einsatz als Stabilisator für die hier verwendeten TM-Nanopartikel zunächst sinnvoll, weil die Untersuchungsergebnisse der Freisetzungsstudien nicht durch in Mizellen solubilisierten Wirkstoff verfälscht werden. Die Vorversuche haben allerdings gezeigt, dass die Kristallisation der TM-Nanopartikel durch Variationen der Pol 188-Konzentration stark beeinflusst wurde: So führte die Verdünnung mit Wasser zu einer Veränderung der T_{Krist} der TM-Donorpartikel (Abbildung 4-3). Dieses Phänomen wurde näher untersucht und ist in Kapitel 4.3 dargestellt.

Durch Einstellen der Donor- und Akzeptorpartikel auf die gleiche Emulgator-Konzentration mittels gemeinsamer Dialyse konnte dieses Problem behoben werden, sodass eine Vermischung nicht mehr zu einer Veränderung der T_{Krist} führte (Abbildung 4-4). Allerdings dauert die Emulgator-Einstellung durch Dialyse relativ lange und ist nicht mit allen Akzeptormedien durchführbar. Aus diesem Grund ist die Verwendung von Pol 188 besonders in den Untersuchungen mit physiologischen Medien problematisch: Um eine T_{Krist} -Verschiebung durch die Verdünnung mit Akzeptormedium zu vermeiden, müsste auch den physiologischen Medien Pol 188 zugefügt und der Emulgatorgehalt in beiden Systemen auf den gleichen Wert

eingestellt werden. Durch den komplexen Aufbau und die vielfältigen Strukturen im Serum besteht bei einer Dialyse allerdings die Gefahr, dass bestimmte Bestandteile aus dem Serum heraus diffundieren und sich so die Zusammensetzung ändert. Außerdem könnten aus dem Serum heraus dialysierte, lipophile Stoffe in die TM-Donoremulsion wandern und dort in die Partikelgrenzfläche eingebaut werden, wodurch wiederum die $T_{K_{rist}}$ beeinflusst würde.

Als Alternative zur Dialyse wurde Pol 188 in verschiedenen Konzentrationen (1 %, 2 %, 5 %, 7 % bezogen auf den gesamten Ansatz) direkt zugegeben und im Serum gelöst. Anschließend wurden die TM-Partikel mit dem Pol 188-angereicherten Serum verdünnt und ihre $T_{K_{rist}}$ verglichen. Es konnte in jedem Ansatz eine Verschiebung der $T_{K_{rist}}$ beobachtet werden, woraus geschlossen wurde, dass in keinem Versuch die gleiche Emulgatorkonzentration in Donor- und Akzeptorsystem erreicht wurde. Im Serum sind verschiedene Strukturen (z.B. Lipoproteine) mit vielen Grenzflächen vorhanden, an denen sich der zugegebene Emulgator vermutlich anlagerte und daher nur noch in reduzierter Konzentration in der Wasserphase vorlag. Letztendlich könnte quasi nie eine Einstellung der gleichen Menge in Donor- und Akzeptorsystem gewährleistet werden. Dies ist aber unumgänglich, um Wirkstofffreisetzungen über die Änderung der $T_{K_{rist}}$ zu verfolgen. Des Weiteren würde man durch eine solche Modifikation der physiologischen Medien weiter von der Widerspiegelung der physiologischen Bedingungen am Applikationsort abrücken.

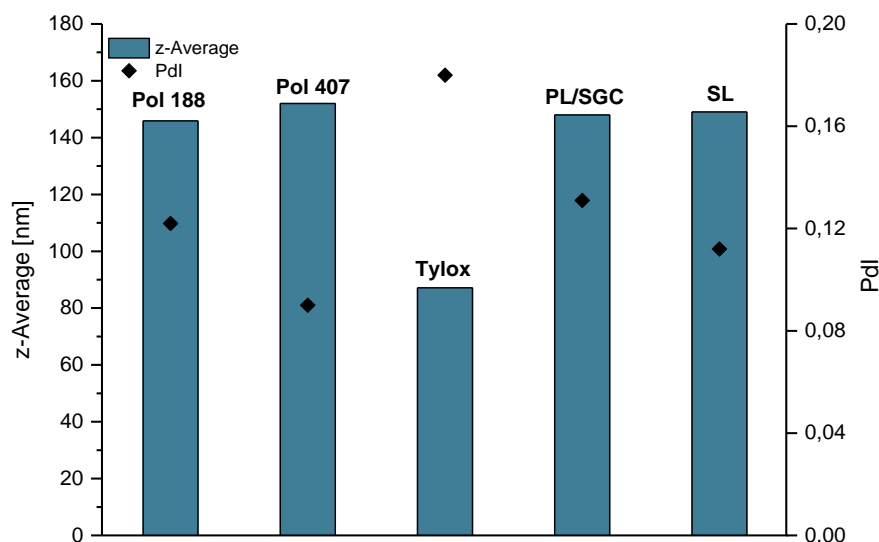


Abbildung 4-12: PCS-Ergebnisse der TM-Nanodispersionen, die entweder mit Saccharoselaurat (SL), Poloxamer 188 (Pol 188), Lipoid S100 (PL) und Natriumglycocholat, Poloxamer 407 (Pol 407) oder Tyloxapol (Tylox) stabilisiert sind. Die Partikelgrößen wurden mittels PCS vermessen.

Aus diesen Gründen wurde nach einer Alternative für Pol 188 zur Stabilisierung der Donorpartikel gesucht: Es wurden TM-Nanopartikel (ER14) unter den bereits bekannten Bedingungen mit den alternativen Emulgatoren Poloxamer 407, Tyloxapol, Saccharoselaurat und Lipoid S100/Natriumglycocholat hergestellt. Anschließend wurden die jeweiligen Emulsionen mit bidestilliertem Wasser in unterschiedlichen Verhältnissen verdünnt und in der DSC vermessen. Mittels PCS konnte gezeigt werden, dass die Herstellung mit unterschiedlichen Emulgatoren jeweils zu Partikeln mit enger Partikelgrößenverteilung führte (Abbildung 4-12). Bei Betrachtung der Thermogramme fiel auf, dass im Gegensatz zu den mit P188-hergestellten Partikeln die Verdünnung der alternativ stabilisierten TM-Systeme mit Wasser zu keiner signifikanten Veränderung der T_{Krist} führte (Abbildung 4-13).

Da Pol 407 sowohl die größte strukturelle Ähnlichkeit zu Pol 188 aufweist, als auch nach der Verdünnung mit Akzeptormedien (1+9, 1+99) eine Konzentration unterhalb der CMC aufwies und daher keine Mizellen bildete [119], wurde dieser Emulgator für die weitere Entwicklung der Freisetzungsmethode zur Stabilisierung der TM-Donorpartikel ausgewählt. Aufgrund der Tatsache, dass eine Verdünnung der mit Pol 407-stabilisierten Partikel nicht mehr zu einer Veränderung der T_{Krist} führte, konnte auf die aufwendige gemeinsame Dialyse von Donor- und Akzeptorpartikeln verzichtet werden. Dies ermöglichte daraufhin den Einsatz von physiologischen Medien wie Serum und Blut.

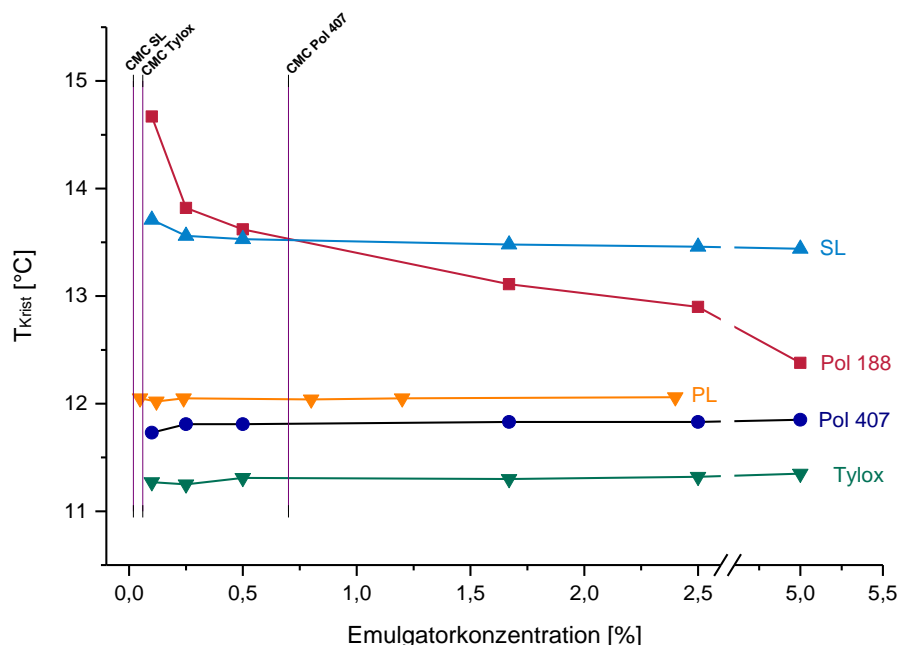


Abbildung 4-13: Kristallisationstemperatur von TM-Nanopartikeln, die entweder mit Saccharoselaurat (SL), Poloxamer 188 (Pol 188), Lipoid S100 (PL) in Kombination mit Natriumglycocholat, Poloxamer 407 (Pol 407) oder Tyloxapol (Tylox) stabilisiert wurden und anschließend mit bidestilliertem Wasser auf verschiedene Emulgator-Konzentrationen verdünnt wurden.

4.2.4 Methodenentwicklung mit Poloxamer 407-stabilisierten Systemen

Nach dem Austausch von Pol 188 gegen Pol 407 zur Stabilisierung der Donor- und Akzeptorsysteme wurden einige Vorversuche wiederholt. Dazu wurden unbeladene mit Pol 407 (5 %) -stabilisierte TM (10 %) -Nanopartikel unter den standardisierten Bedingungen hergestellt. Sie konnten reproduzierbar in drei verschiedenen Ansätzen produziert werden (ER22) und zeigten vergleichbare Charakteristika: eine Partikelgröße von 150 nm mit PdIs von stets unter 0,1, sowie annähernde gleiche Werte für die T_{Krist} (12,08 °C, 12,10 °C, 12,04 °C). Eine als Akzeptorsystem vorgesehene Rapsöl-Nanoemulsion wurde ebenfalls mit Pol 407 stabilisiert und unter den gleichen Bedingungen hergestellt, wobei auch hier eine Partikelgröße von 150 nm mit einem PdI von unter 0,1 resultierte.

4.2.4.1 Reproduzierbarkeit

Abbildung 4-14 zeigt die gute Reproduzierbarkeit der T_{Krist} -Messungen der TM-Donorpartikel nach dem Austausch des Emulgators von Pol 188 gegen Pol 407 in den zuvor eruierten Mischungsverhältnissen mit bidestilliertem Wasser. Bei den höheren Verdünnungen war die Standardabweichung der Messungen etwas größer, aufgrund des kleineren und damit schwieriger auswertbaren Kristallisationssignals.

4.2.4.2 Beladung von Poloxamer 407-stabilisierten TM-Partikeln

Für die Berechnung der freigesetzten Wirkstoffmenge mittels der neu entwickelten DSC-Methode wurde die Änderung der T_{Krist} der TM-Nanopartikel bedingt durch die

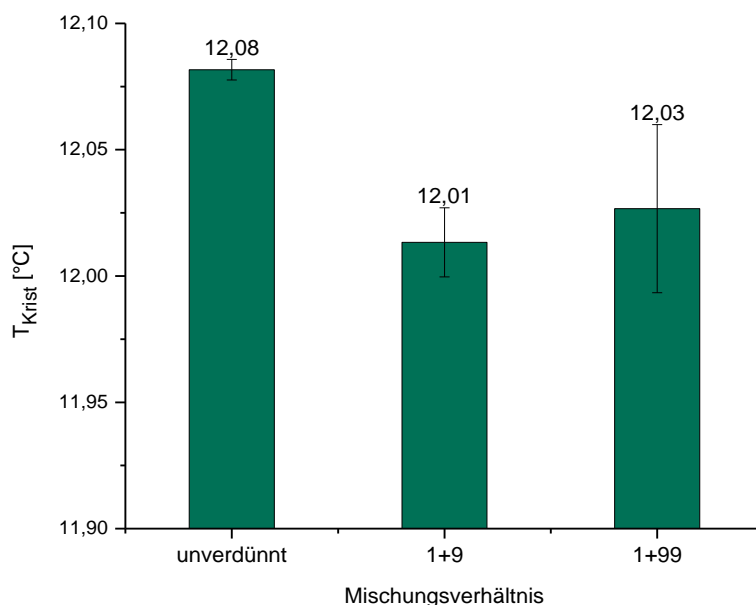


Abbildung 4-14: Reproduzierbarkeitsmessungen der T_{Krist} von Poloxamer 407-stabilisierten TM-Partikeln nach Verdünnung mit bidestilliertem Wasser ($n=6$, \pm SD).

Wirkstofffreisetzung gemessen. Dafür ist die Kenntnis der T_{Krit} sowohl der beladenen als auch der unbeladenen Partikel notwendig. Die passive Beladung stellt eine gute Möglichkeit dar, um diese beiden Werte für die T_{Krit} der TM-Partikel eines Ansatzes zugänglich zu machen: Bei dieser Methode werden die Nanopartikel zunächst unbeladen hergestellt und anschließend durch Inkubation mit dem entsprechenden Wirkstoff beladen [40,129]. Diese Methode konnte erfolgreich für die Beladung von Pol 188-stabilisierten TM-Nanopartikeln mit den Wirkstoffen FB, BMV und OL angewendet werden (Kapitel 4.2.1.2). Die passive Beladung der mit Pol 407-stabilisierten Partikeln stellte sich hingegen als problematisch heraus: Eine TM-Nanoemulsion (ER14, T_{Krit} : 11,62 °C) wurde 7 Tage mit den entsprechenden Wirkstoffen inkubiert. Allerdings führte nur die Beladung mit FB zu einer Veränderung der T_{Krit} (11,15 °C), während die Beladung mit BMV (T_{Krit} : 11,61 °C) und OL (T_{Krit} : 11,57 °C) auch nach 7 Tagen Inkubation zu keinerlei Veränderung der T_{Krit} führte. Infolgedessen wurde vermutet, dass keine Beladung der Partikel stattgefunden hat. Um diesen Sachverhalt genauer zu beleuchten, wurde der Wirkstoffgehalt der mit BMV inkubierten Partikel photometrisch überprüft. Es zeigte sich, dass tatsächlich kein Wirkstoff in den Partikeln enthalten war. Die photometrische Bestimmung des OL-Gehaltes war aufgrund der sich überschneidenden Absorptionsmaxima mit dem des Trimyristins nicht möglich. Es scheint also, dass eine passive Beladung von Pol 407-stabilisierten TM-Partikeln nicht mit allen Wirkstoffen realisierbar ist. Möglicherweise spielt auch die Wirkstofflokalisierung bei der Erklärung dieses Phänomens eine Rolle: BMV ist eher an der Partikeloberfläche lokalisiert [40], wodurch es zu einer Art Konkurrenz um den Platz zwischen Wirkstoffmolekülen und den Molekülen des Pol 407 kommen könnte. Die Ergebnisse aus den Verdünnungsversuchen ließen darauf schließen, dass die Pol 407-Moleküle im Vergleich zu Pol 188 eine besondere Beständigkeit an der Partikelgrenzfläche aufzuweisen scheinen und sich deshalb nicht so leicht von der Grenzfläche verdrängen lassen. Dies könnte zur Folge haben, dass die Wirkstoffmoleküle keinen Platz zur Adsorption an die Oberfläche der Lipidpartikel haben, wodurch die Beladung erschwert bzw. verhindert wird. Diese Hypothese wird durch die Beladungsergebnisse mit FB unterstützt. Hier wurde eine Beladung der Partikel durch die Änderung der T_{Krit} beobachtet. FB ist hauptsächlich im Kern von Emulsionstropfen lokalisiert [130,131], wodurch es zu keiner Konkurrenz mit den Emulgatormolekülen an der Grenzfläche kommen würde, sodass eine ungehinderte Beladung erfolgen könnte. Da OL eine höhere Lipophilie und eine schlechtere Wasserlöslichkeit besitzt (Tabelle 3-3), erfolgt die Auflösung des Wirkstoffs und der Übertritt über die Wasserphase vermutlich sehr langsam und die Inkubationsdauer könnte nicht ausgereicht haben, um eine Beladung der Partikel zu erzielen.

Um die Freisetzung der ausgewählten Wirkstoffe (FB, OL, TPA, Q10) trotzdem mit der DSC-Methode untersuchen zu können, wurde auf die konventionelle Beladung ausgewichen. Hierbei wurde der entsprechende Wirkstoff direkt bei der Herstellung der Trägerpartikel (ER22+ER23) in der Lipidschmelze gelöst, mit der wässrigen Phase vereinigt und hochdruckhomogenisiert [42,45]. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen der lipophilen Wirkstoffe verwendet und die Änderung der T_{Krit} anschließend mittels DSC untersucht. Alle ausgesuchten Wirkstoffe führten zu einer linearen Abnahme der T_{Krit} mit steigender Beladung (Abbildung 4-15). Diese Korrelation diente als Grundlage für die Quantifizierung der Wirkstofffreisetzung. Zur Verifizierung erfolgte eine photometrische Gehaltsbestimmung der jeweils enthaltenen Wirkstoffmenge, wodurch sichergestellt wurde, dass die mittels DSC erhaltenen Daten richtig sind (Anhang A3). Allerdings konnte OL nicht photometrisch quantifiziert werden, da es ein Absorptionsmaximum bei 210 nm aufweist und in diesem Bereich auch TM absorbiert. Die Abwesenheit von Wirkstoffkristallen in den beladenen Emulsionen wurde jeweils polarisations-lichtmikroskopisch überprüft und bestätigt.

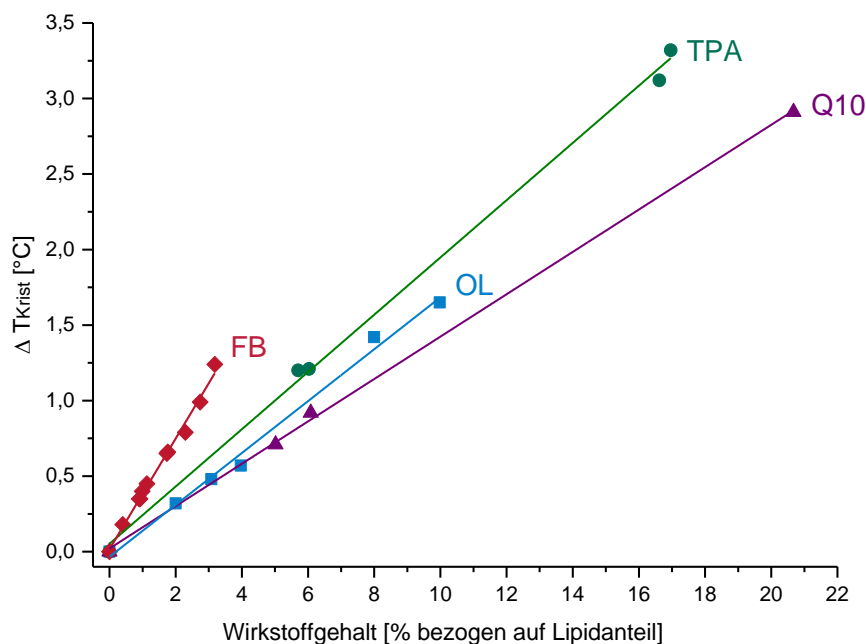


Abbildung 4-15: Korrelation der Kristallisationstemperatur von TM-Nanopartikeln mit der Beladungsmenge von den Wirkstoffen Fenofibrat (FB), α -D-Tocopherolacetat (TPA), Orlistat (OL), Ubidecarenon (Q10) ($n=3$ DSC-Messungen, $\pm 0,05$ °C).

4.2.4.3 Stabilitätsuntersuchungen der Donorpartikel in Schweineserum

Um mögliche Veränderungen im Kristallisationsverhalten durch Interaktion mit Serumbestandteilen zu identifizieren, wurden auch die mit Pol 407-stabilisierten TM-Partikel bei zwei verschiedenen Temperaturen (25 °C und 37 °C) über 24 Stunden in Schweineserum inkubiert und zu gegebenen Zeitpunkten in der DSC kristallisiert (Abbildung 4-16). Die Ergebnisse zeigten, dass Freisetzungsuntersuchungen in Schweineserum bei 25 °C nur innerhalb der ersten vier Stunden möglich sind. Während dieses Zeitraumes blieb die T_{Krist} konstant, danach veränderten sich jedoch die T_{Krist} und die Peakgeometrie erheblich. Die T_{Krist} wurde signifikant zu höheren Temperaturen verschoben, wodurch keine korrekte Auswertung des Wirkstofftransfers möglich war. Eine Inkubation bei 37 °C führte bereits nach zwei Stunden zu einer erheblichen Beeinflussung des Kristallisationsereignisses. Durch die erhöhte Temperatur könnte die Lipaseaktivität gesteigert sein, sodass eine schnellere Hydrolyse der Triglyceride in Monoglyceride und freie Fettsäuren erfolgte. Bei Betrachtung lediglich der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung war keine Veränderung bzw. Instabilität der Partikel im Schweineserum zu erkennen, da sich diese über den Messzeitraum nicht veränderten (Abbildung 4-16). Wie schon in den Untersuchungen mit Pol 188-stabilisierten Systemen erwies sich die DSC im Hinblick auf Abbauprozesse solcher Partikel als eine wesentlich sensitivere Methode als die Partikelgrößenanalyse mittels PCS. Im Vergleich der Ergebnisse aus den Stabilitätsuntersuchungen der Pol 188-stabilisierten TM-Partikeln (Kapitel 4.2.2.1) mit denen der Pol 407-stabilisierten TM-Partikeln wird deutlich, dass der Abbau der TM-Partikel unterschiedlich zu sein scheint, da sich die jeweiligen Thermogramme voneinander

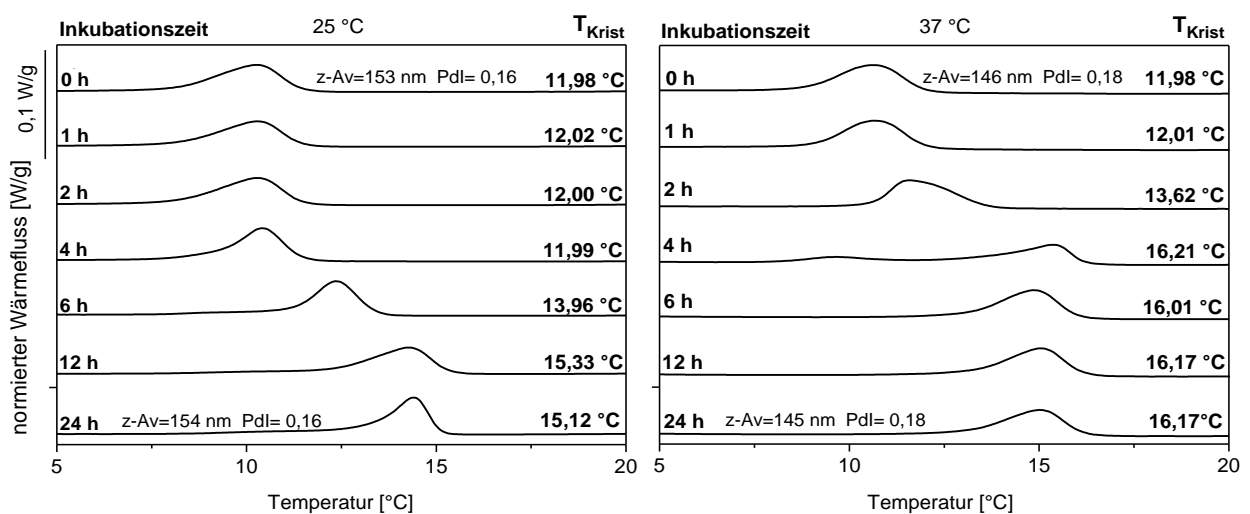


Abbildung 4-16: DSC-Kristallisationskurven und T_{Krist} von unbeladenen TM-Nanopartikeln inkubiert in Schweineserum [1+9] bei 25 °C und bei 37 °C über 24 Stunden. Die Partikelgrößencharakterisierung erfolgte vor und nach Inkubation mittels PCS.

unterscheiden. Während der Abbau der Partikel bei Pol 188 durch die Ausbildung einer linken Schulter des Hauptpeaks deutlich wurde, zeigte sich bei den Pol 407-Partikeln eine Verschiebung des kompletten Kristallisationsevents hin zu höheren Temperaturen ohne Spaltung des Peaks. Da es sich bei der Lipolyse um einen Grenzflächenprozess handelt, wobei die Bindung der Lipase an die Partikelgrenzfläche den entscheidenden Schritt darstellt und damit die Abbaurate bestimmt [132], könnte der unterschiedliche molekulare Aufbau der Emulgatoren verantwortlich für die unterschiedlichen Ergebnisse sein (Abbildung 4-17). Sowohl durch die größere Sperrschicht der längeren PEO-Ketten, als auch durch die bessere Grenzflächenabdeckung durch die größeren PPO-Blöcke des Pol 407 erfolgt der Triglycerid-Abbau durch Lipasen langsamer als bei den Pol 188-stabilisierten Systemen [133,134]. Studien konnten zeigen, dass die Eliminationsrate von Triglyceridpartikeln durch die Änderung der Anteile von Pol 188 und Pol 407 modifiziert werden konnte [134]. Sobald der Anteil von Pol 407 erhöht wurde, sanken die Lipolyserate und die Abbaugeschwindigkeit der Partikel. Insgesamt lässt sich aber sagen, dass sich die mit der neuen DSC-Methode gewonnenen Daten nicht ganz einfach mit Literaturwerten vergleichen lassen. Zur genaueren Untersuchung dieses Abbaus ist der Einsatz einer Methode sinnvoll, die zum Beispiel eine direkte Auswertung der Abbauprodukte ermöglicht.

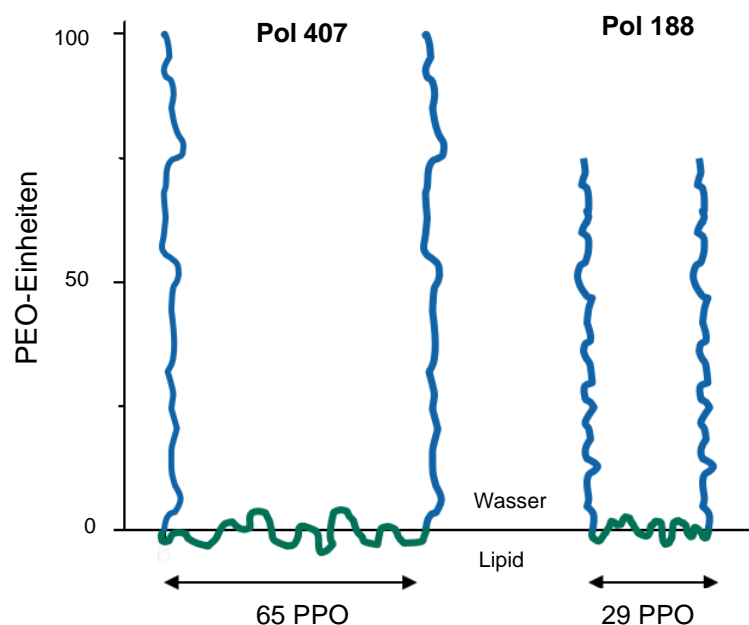


Abbildung 4-17: Darstellung der Verteilung der PEO- und der PPO-Einheiten von Poloxamer 407 und Poloxamer 188 im Vergleich.

4.2.4.4 Beurteilung der Verwendbarkeit von Poloxamer 407 zur Stabilisierung in Freisetzungsuntersuchungen

Die Ergebnisse der Voruntersuchungen mit Pol 407-stabilisierten TM-Partikeln ließen die Schlussfolgerung zu, dass die Verwendung von Pol 407 trotz einiger Einschränkungen eine sinnvolle Weiterentwicklung der Donor-Formulierung darstellte. Im Gegensatz zu Pol 188-stabilisierten TM-Partikeln konnte bei Pol 407-stabilisierten Partikeln keine signifikante Beeinflussung der T_{Krist} durch die Verdünnung mit den verschiedenen Akzeptorsystemen festgestellt werden, wodurch die aufwendige und fehleranfällige Dialyse von Donor- und Akzeptorpartikel entfällt. Dadurch erhöhte sich die verfügbare Akzeptorvielfalt, sodass auch physiologische Medien wie Serum oder Blut eingesetzt werden konnten.

4.2.5 Transferuntersuchungen

Mittels Transferuntersuchungen sollte die grundlegende Eignung der neu entwickelten Methode für Freisetzungsuntersuchungen von schwer wasserlöslichen Wirkstoffen aus kolloidalen TM-Partikeln getestet werden. Dazu wurden drei verschiedene Medien mit steigender Komplexität und Annäherung an physiologische Bedingungen als Akzeptorsysteme ausgewählt: als erstes wurde der Wirkstofftransfer in die Tropfen einer Rapsöl-Nanoemulsion verfolgt, die den Anteil an lipophilen Kompartimenten im Blut simulieren sollten. Anschließend wurde der Wirkstofftransfer in die physiologischen Medien Schweineserum und Schweineblut untersucht. Alle Freisetzungsuntersuchungen wurden in zwei verschiedenen Mischungsverhältnissen von Donor- und Akzeptorpartikeln durchgeführt, um die Auswirkung eines Verteilungsgleichgewichtes auf den Transfer zu untersuchen. Um zusätzlich den Einfluss der Lipophilie der Wirkstoffe auf die Geschwindigkeit der Freisetzung untersuchen zu können, wurden vier Wirkstoffe mit unterschiedlicher Lipophilie für diese Studien ausgewählt. Als Maß für die Lipophilie der Wirkstoffe diente der logP-Wert, wobei FB den niedrigsten Wert aufweist und daher den am wenigsten lipophilen Wirkstoff in der Reihe darstellt. Anschließend folgen OL, TPA und Q10, welches die höchste Lipophilie in dieser Reihe aufweist.

4.2.5.1 Generelle Vorbereitungen

Unbeladene TM-Partikel wurden als Kontrolle eingesetzt. Sie wurden reproduzierbar in drei verschiedenen Ansätzen hergestellt und zeigten annähernd gleiche T_{Krist} (12,08 °C, 12,10 °C, 12,04 °C). In allen für die Freisetzungsuntersuchungen vorbereiteten, wirkstoffhaltigen Systemen konnte eine Abnahme der Kristallisationstemperatur im Vergleich zu den Kontroll-Partikeln beobachtet werden (Abbildung 4-15).

Um den Transfer zu induzieren, wurden die beladene TM-Donoremulsionen mit dem jeweiligen Akzeptormedium in zwei verschiedenen Verhältnissen vermisch: 1+9 und 1+99 (Donor+Akzeptor).

Diese Mischungsverhältnisse sollten sowohl die Untersuchung des Einflusses der zugegebenen Akzeptormenge auf das Wirkstofffreisetzungsverhalten ermöglichen als auch die Verdünnung der Donorpartikel nach intravenöser Applikation im Blutstrom simulieren. Für eine realistische Simulation der *in vivo*-Verhältnisse müsste die Verdünnung des Arzneistoffträgersystems allerdings wesentlich höher als 1+99 sein. Vorversuche zeigten aber, dass der TM-Kristallisationspeak bei höheren Verdünnungen aufgrund eines zu geringen Wärmestroms nicht mehr adäquat ausgewertet werden konnte (Abbildung 4-3).

In Abbildung 4-18 ist die gute Reproduzierbarkeit der T_{Krist} -Messungen an den TM-Nanopartikeln in den drei verschiedenen Akzeptormedien bei den ausgewählten Mischungsverhältnissen dargestellt, erkennbar an den geringen Standardabweichungen. Bei den höheren Verdünnungen war die Standardabweichung der Messungen aufgrund des kleineren und damit schwieriger auswertbaren Kristallisationssignals etwas größer. Die Mischung mit den Freisetzungsmitteln führte im Vergleich zu den unverdünnten TM-Partikeln in allen Verdünnungen zu einer leichten Reduktion der T_{Krist} , die lediglich als Messschwankung

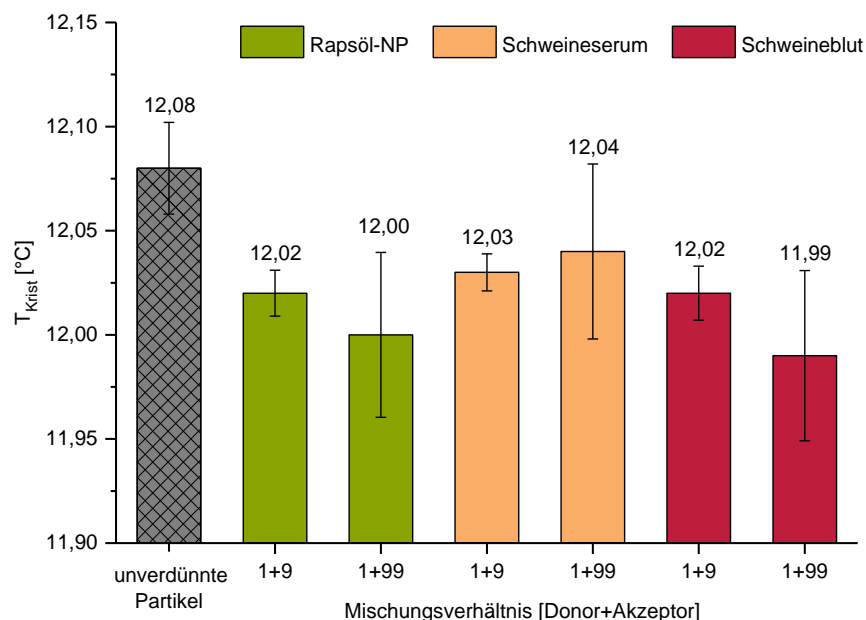


Abbildung 4-18: Reproduzierbarkeit der T_{Krist} von Pol 407-stabilisierten TM-Nanopartikeln, die in zwei unterschiedlichen Verhältnissen mit verschiedenen Akzeptormedien (Rapsöl-Nanopartikel sind auch mit Pol 407-stabilisiert) gemischt wurden ($n=6$).

beurteilt wurde. Aufgrund der nur sehr gering ausgeprägten Temperaturverschiebungen war eine Auswertung des Wirkstofftransfers über die Änderung der T_{Krist} möglich.

Die Zeitpunkte für die Probenzüge wurden anhand der Dauer einer DSC-Messung festgelegt: eine Kristallisation von 25 °C bis 0 °C mit einer Geschwindigkeit von 2,5 K/min dauert 10 Minuten. Als Messzeitpunkt für die Betrachtung der Freisetzungskinetik wurde der Start der Messung definiert. Die hier erreichbare Zeitauflösung fällt demnach geringer aus als bei anderen Methoden [64,95]. Da die Nanopartikel aber eine gewisse Zeit benötigen, um ihr Target zu erreichen [135,136], wurde die Zeitauflösung als ausreichend beurteilt, um eine praktisch relevante Verzögerung der Freisetzung festzustellen.

4.2.5.2 Ermittlung der freigesetzten Wirkstoffmenge

Da die T_{Krist} der TM-Nanopartikel durch die Wirkstoffbeladung sinkt, konnte der Wirkstofftransfer zu den lipophilen Akzeptorpartikeln über ein Ansteigen der T_{Krist} proportional zum freigesetzten Wirkstoffgehalt verfolgt werden. Diese Änderung der T_{Krist} wurde im Vergleich zu einer unbeladenen Kontrolle berechnet. Dazu wurde die durch Wirkstoffbeladung bedingte Änderung der Kristallisationstemperatur (ΔT_{gesamt}) ermittelt, indem die T_{Krist} der unbeladenen Partikel (Kontrollpartikel) von der T_{Krist} der beladenen Partikel (Donorpartikel) subtrahiert wurde. Die sich ergebende Temperaturdifferenz wurde gleich 100 % Wirkstoff gesetzt. Die ermittelte T_{Krist} der Probe (Donorpartikel) im Akzeptormedium wurde zu einem bestimmten Zeitpunkt von der T_{Krist} der Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt subtrahiert (ΔT_t), um Messschwankungen auszugleichen. Mittels Dreisatzberechnung konnte anschließend über die Änderung der T_{Krist} die freigesetzte Wirkstoffmenge zum Zeitpunkt t bestimmt werden (Gleichung 2).

$$100 - \left(\frac{\Delta T_t}{\Delta T_{\text{gesamt}}} \cdot 100 \right) = \text{freigesetzte Wirkstoffmenge [\%]} \quad [\text{Gleichung 2}]$$

Zum besseren Verständnis folgt ein Beispiel zur Berechnung der freigesetzten Wirkstoffmenge über die Änderung der T_{Krist} . Aufgrund der hohen Temperaturdifferenz zwischen beladenen und unbeladenen Partikeln wurde dafür eine Freisetzungsuntersuchung von TPA aus TM-Nanopartikeln in eine Rapsöl-Nanoemulsion ausgewählt. Abbildung 4-19 zeigt die dazugehörigen Kristallisationskurven. Die unbeladenen TM-Partikel, die als Kontrolle dienten, kristallisierten bei 11,86 °C, was einem Wirkstoffgehalt von 0 % in den Partikeln entsprach. Durch die Wirkstoffbeladung der Partikel bei der Herstellung sank die T_{Krist} auf 7,88 °C. Die Differenz der Kristallisationstemperaturen (ΔT_{Krist}) der beladenen und der unbeladenen

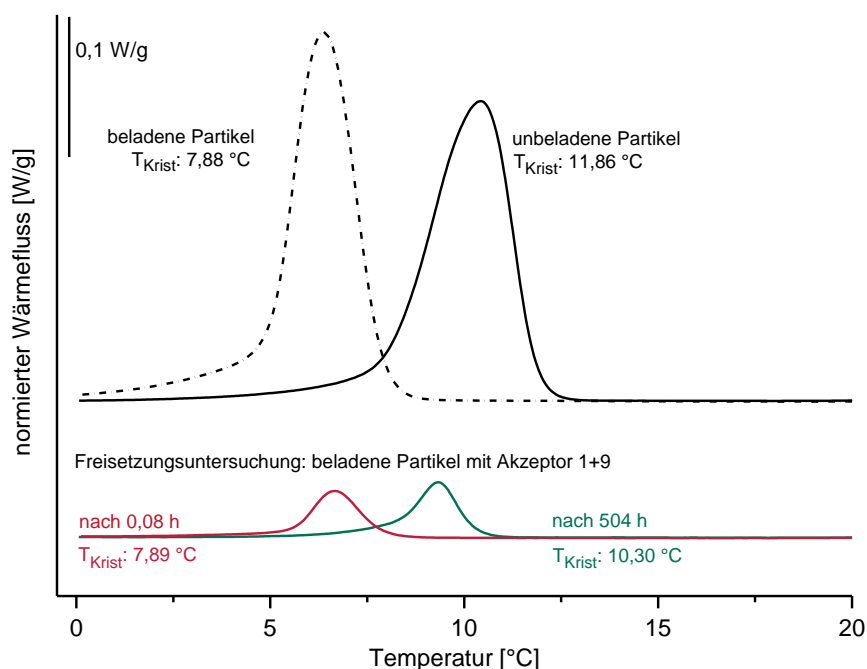


Abbildung 4-19: DSC-Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchung von Tocopherolacetat-beladenen TM-Nanopartikeln in Rapsöl-Nanoemulsion (Donor + Akzeptor: 1+9) über 504 Stunden.

Partikel betrug demnach $3,98\text{ °C}$. Diese Differenz entsprach einem absoluten Wirkstoffgehalt von $16,6\%$ bezogen auf den Lipidanteil und wurde auf 100% Wirkstoffgehalt in den Partikeln gesetzt. In dieser Transferuntersuchung wurden Donor- und Akzeptorpartikel 1+9 gemischt, wodurch das Wärmestromintegral wie erwartet um 90% sank. Die T_{Krit} der beladenen Partikel stieg während der 500 Stunden Inkubationsdauer von $7,89\text{ °C}$ auf $10,30\text{ °C}$ an. Dieser Temperaturanstieg um $2,41\text{ °C}$ wurde durch eine Wirkstofffreisetzung aus den TM-Partikeln hin zu den lipophilen Kompartimenten der Rapsöl-Nanoemulsion bedingt und entsprach einem in den TM-Partikeln verbleibenden Wirkstoffgehalt von $39,4\%$ und einem freigesetzten Anteil von $60,6\%$. Als Kontrolle wurden unbeladene TM-Nanopartikel in gleicher Weise mit der Rapsöl-Nanoemulsion vermischt und zu den gleichen Zeitpunkten in der DSC kristallisiert. So konnten Fluktuationen der T_{Krit} im Vergleich zu unbeladenen TM-Nanopartikeln identifiziert werden. Diese Abweichungen wurden von der Änderung der T_{Krit} der eigentlichen Proben in den Freisetzungsuntersuchungen subtrahiert, da diese nicht durch einen Wirkstofftransfer, sondern durch die Sensitivität der Messmethode begründet sind.

4.2.5.3 Freisetzungsuntersuchungen in Rapsöl-Nanoemulsion

Zuerst wurden die Freisetzungsuntersuchungen im einfachsten aller ausgewählten Akzeptormedien durchgeführt. Die T_{Krit} der beladenen TM-Donorpartikel wurde nach

Mischung mit einer Rapsöl-Nanoemulsion zu bestimmten Zeitpunkten über 24 Stunden lang in der DSC vermessen.

Die als Kontrolle mitgeführten unbeladenen TM-Partikel wurden in gleicher Weise vorbereitet und zeigten, im Vergleich zu den unbeladenen Partikeln ohne Akzeptormedium keine signifikante Veränderung der $T_{K_{rist}}$ über 24 Stunden (maximale Abweichung von 0,03 °C). In Abbildung 4-204-20 sind die Transferergebnisse für die unterschiedlichen Wirkstoffe in einer Rapsöl-Nanoemulsion graphisch dargestellt (Fraktion transferierter Wirkstoff über Transferzeit). Nach Zugabe des Akzeptors stieg die $T_{K_{rist}}$ der FB-beladenen TM-Nanopartikel schlagartig an, weshalb eine sofortige Wirkstofffreisetzung vermutet wurde. Innerhalb der ersten 10 Minuten wurde ein maximaler Wert mit einem nachfolgenden Plateau erreicht und die Freisetzung schien bereits beendet zu sein. Der Anteil an freigesetztem Wirkstoff bei dem Mischungsverhältnis 1+9 war kleiner als bei dem höheren Mischungsverhältnis von 1+99. Unter Annahme einer homogenen Verteilung des FB in den Lipidmatrices der Donor- und Akzeptorpartikel würde bei vollständiger Freisetzung ein verbleibender Wirkstoffanteil von 90 % (bei der 1+9 Verdünnung) bzw. 99 % (bei der 1+99 Verdünnung) in den Akzeptorpartikeln erwartet werden. Die Resultate bestätigten die Annahme einer homogenen Verteilung des Wirkstoffs, ohne besondere Affinität zu einem der verwendeten Lipide: es konnte ein freigesetzter Wirkstoffanteil von 88 % bei dem 1+9 Verhältnis und ein Anteil von 98 % bei dem 1+99 Verhältnis gefunden werden. Der Anteil des freigesetzten Wirkstoffs wurde offensichtlich durch ein Verteilungsgleichgewicht bestimmt: je mehr lipophile Akzeptoren verfügbar waren, desto mehr Wirkstoff wurde freigesetzt. Insgesamt führte die Beladung mit FB nur zu einer geringen Reduktion der $T_{K_{rist}}$ (ca. 0,54 °C für 3 % FB, bezogen auf den Lipidanteil), sodass der Unterschied in der $T_{K_{rist}}$ zwischen beladenen und unbeladenen TM-Partikeln nur sehr klein war. Dadurch führten schon kleine Messschwankungen und Fluktuationen zu relativ großen Standardabweichungen.

OL-beladene Partikel zeigten einen langsameren Anstieg der $T_{K_{rist}}$, welcher in der 1+9 Mischung bei Erreichen eines Verteilungsgleichgewichts des Wirkstoffs zwischen Akzeptor und Donor bei ca. 85 % freigesetztem Wirkstoff stoppte. Folglich wurde die $T_{K_{rist}}$ der unbeladenen Partikel in dieser Mischung nicht erreicht. Bei einem höheren Mischungsverhältnis von 1+99 wurde allerdings wesentlich mehr Wirkstoff freigesetzt (scheinbar über 100 %). Auch diese Ergebnisse deuteten auf den Einfluss eines Verteilungsgleichgewichts auf die Wirkstofffreisetzung hin. Die vermeintliche Freisetzung von über 100 % ergab sich aus dem Anstieg der $T_{K_{rist}}$ der beladenen Partikel während der

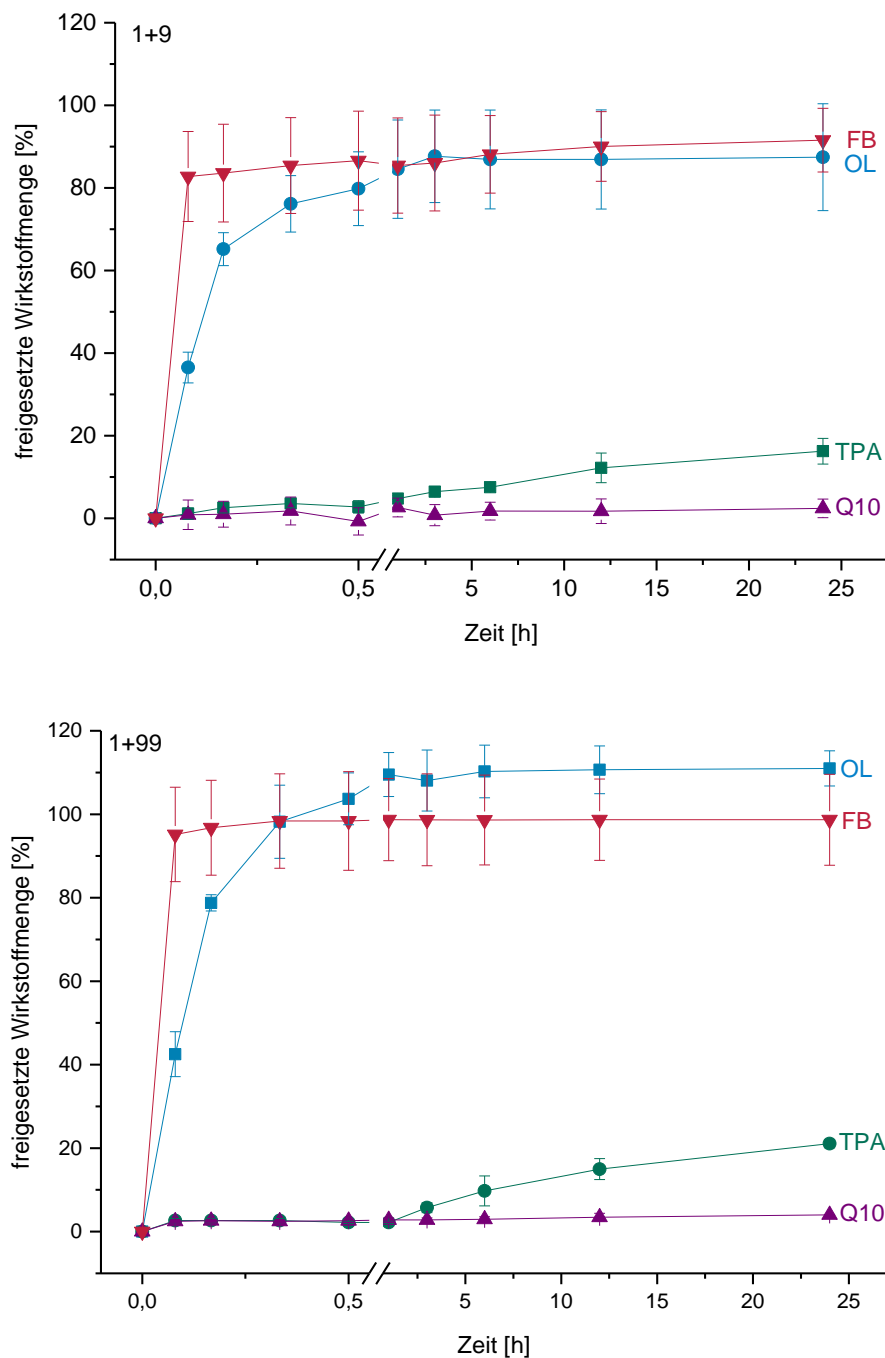


Abbildung 4-20: Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchungen von Orlistat (OL), Fenofibrat (FB), α -D-Tocopherolacetat (TPA) und Ubidecarenon (Q10) aus TM-Nanopartikeln in eine Rapsöl-Nanoemulsion in zwei Mischungsverhältnissen (1+9 (oben), 1+99 (unten)) bei 25 °C über 24 Stunden (\pm SD, $n = 3$ Freisetzungsexperimente).

Freisetzungsuntersuchung über den Wert der theoretisch ermittelten T_{Krist} der „leeren“ Partikel. Da die T_{Krist} der „leeren“ Partikel nach vollständiger Wirkstofffreisetzung nicht zugänglich ist, wurde die T_{Krist} der unbeladenen Kontrollpartikel als Ausgangs-Temperatur und für die Berechnung verwendet. Daher ist die zugrundeliegende T_{Krist} nur eine Annäherung an die wahre

$T_{K_{rist}}$ der leeren Partikel und kann leicht variieren, wodurch auch Freisetzungsergebnisse von scheinbar über 100 % erreicht werden konnten. Allerdings wurden die Kontrollpartikel und die beladenen Partikel exakt unter denselben Bedingungen mit der gleichen Partikelgröße (± 4 nm) hergestellt, wodurch die $T_{K_{rist}}$ annähernd gleich sein sollte. Die $T_{K_{rist}}$ der TPA-beladenen Partikel stieg in beiden Mischungsverhältnissen nur sehr langsam an. Dies deutete auf einen langsamen Wirkstofftransfer hin, der innerhalb des Untersuchungszeitraums von 24 Stunden noch nicht abgeschlossen war, da kein Plateau erreicht wurde. Es wurden bis dahin in beiden Mischungsverhältnissen unter 20 % Wirkstoff freigesetzt. Die mit Q10-beladenen Partikel zeigten nach Mischen mit dem Akzeptormedium keinerlei Veränderung ihrer $T_{K_{rist}}$. Es konnte also kein Wirkstofftransfer zwischen Donor- und Akzeptorpartikeln innerhalb des Zeitrahmens des Experiments festgestellt werden.

Da nach 24 Stunden der Wirkstofftransfer von TPA und Q10 noch nicht abgeschlossen war, wurde ein neuer Versuch mit verlängertem Untersuchungszeitraum für diese beiden Wirkstoffe in einer Rapsöl-Nanoemulsion mit einem Mischungsverhältnis von 1+9 durchgeführt. In Abbildung 4-21 sind die Änderungen der $T_{K_{rist}}$ über die Zeit und der berechnete Anteil an freigesetztem Wirkstoff dargestellt. Auch nach über 400 Stunden konnte keinerlei Freisetzung des Q10 detektiert werden. TPA wurde über den gesamten Messzeitraum langsam und kontinuierlich freigesetzt, allerdings auch nach über 432 Stunden nicht vollständig. Die mitgeführten Kontrollmessungen zeigten über die gesamte Untersuchungsdauer keine

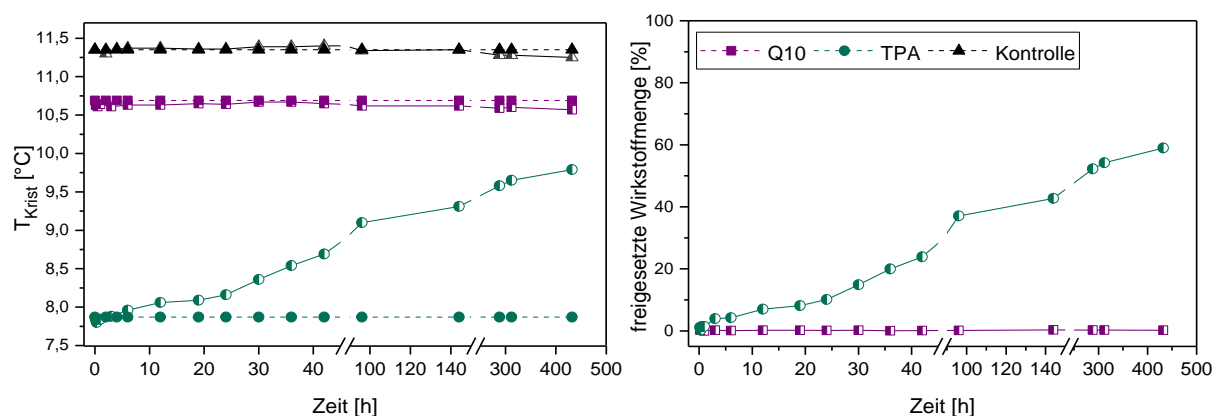


Abbildung 4-21: Freisetzung der Wirkstoffe α -D-Tocopherolacetat (TPA) und Ubidecarenon (Q10) aus TM-Nanopartikeln in eine Rapsöl-Nanoemulsion (Mischungsverhältnis 1+9) über 432 Stunden bei 25 °C ($n=1$ Freisetzungsuntersuchung). Beide Dispersionen sind mit Pol 407 stabilisiert. Links ist die Änderung der $T_{K_{rist}}$ über die Zeit dargestellt, wobei unbeladene TM-Nanopartikel vermisch mit der Rapsöl-Nanoemulsion (1+9) als Kontrolle (schwarz) mitgeführt wurden. Die beladenen Partikel wurden zusätzlich in gleichem Verhältnis mit Wasser gemischt und zur selben Zeit in der DSC vermessen (ausgefüllte Symbole). Rechts ist der über die Änderung der $T_{K_{rist}}$ berechnete Anteil des freigesetzten Wirkstoffs über die Zeit dargestellt.

signifikanten Änderungen der T_{Krist} und bestätigten damit die Anwendbarkeit der neu entwickelten DSC-Methode, auch für Untersuchungen von verzögerten Wirkstofffreisetzungen.

Bei Betrachtung der Freisetzungsergebnisse unter Berücksichtigung der dazugehörigen logP-Werte fiel auf, dass je höher die Lipophile des Wirkstoffs (ausgedrückt als logP) ist, desto langsamer die Freisetzung erfolgte: FB (logP: 5,8) hat den niedrigsten logP-Wert und wurde schlagartig innerhalb der ersten Minuten freigesetzt, OL ist etwas lipophiler (logP: 7,0) und wurde leicht verzögert freigesetzt, TPA zeigte durch eine noch höhere Lipophilie (logP: 10,7) einen verlangsamten Transfer, während für den lipophilsten Wirkstoff der Reihe Q10 (logP: 19,1) praktisch keine Wirkstofffreisetzung festgestellt werden konnte.

4.2.5.4 Vergleich Poloxamer 188 und 407 in Freisetzungsuntersuchungen mit Fenofibrat

Ein Vergleich der Freisetzungsuntersuchungen von FB in Rapsöl-Nanoemulsionen (ER13_R, ER_22-R) zeigte, dass annähernd gleiche Ergebnisse erhalten wurden, unabhängig davon, ob die Donor- und Akzeptorpartikel mit Pol 407 (ER24_FB) oder mit Pol 188 (ER13_FB) stabilisiert wurden (Abbildung 4-20). Die Partikel der Donor- und Akzeptor-Emulsionen wurden unter den üblichen Bedingungen am Microfluidizer hergestellt und anschließend passiv mit 3 % FB über 120 Stunden beladen. Die mit Pol 188 stabilisierten

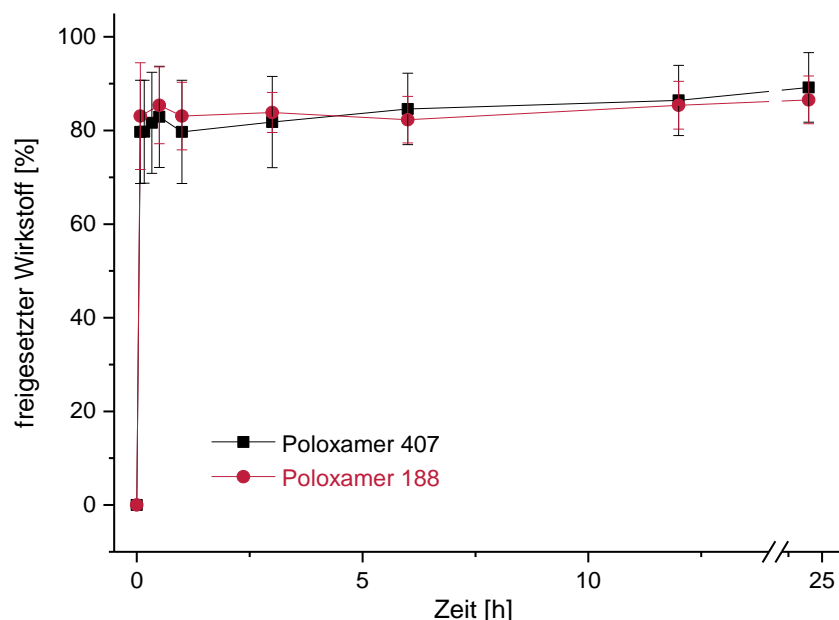


Abbildung 4-22: Vergleich der Freisetzung von Fenofibrat (3 % bezogen auf TM) aus TM-Nanopartikeln in eine Rapsöl-Nanoemulsion [1+9] (n=2 Freisetzungsuntersuchungen). Stabilisiert wurden die Donor- und Akzeptoremulsionen entweder mit Poloxamer 188 oder mit Poloxamer 407. Bei den Untersuchungen mit Pol 188 wurden die Systeme zuvor auf einen Gehalt von ca. 1,5 % Emulgator in der Wasserphase dialysiert.

Systeme wurden zuvor mittels gemeinsamer Dialyse auf ca. 1,5 % Emulgator-Gehalt eingestellt. Das Mischungsverhältnis in den Freisetzungsuntersuchungen betrug jeweils 1+9 [Donor+Akzeptor].

4.2.5.5 Freisetzungsuntersuchungen in Schweineserum

Wie bereits in Vorversuchen festgestellt wurde, konnte die Freisetzung in Schweineserum aufgrund von Abbauprozessen der TM-Nanopartikel nur über vier Stunden untersucht werden. In Abbildung 4-23 sind die Transferergebnisse dargestellt. Der Anteil an freigesetztem Wirkstoff und die Freisetzungsgeschwindigkeit sind tendenziell mit den Freisetzungsergebnissen in der Rapsöl-Nanoemulsion vergleichbar: FB-beladene Partikel zeigten eine schnelle Freisetzung innerhalb der ersten Minuten und bei höherem Mischungsverhältnis wurde mehr Wirkstoff freigesetzt. Allerdings endete die Transferkurve auf einem signifikant geringeren Plateaulevel, verglichen mit den Freisetzungsstudien in der Rapsöl-Nanoemulsion. Auch diese Ergebnisse legen einen Verteilungsgleichgewichtsgesteuerten Prozess nahe. Ebenfalls vergleichbar wurde auch OL in Schweineserum verzögert und bei einem höheren Mischungsverhältnis verstärkt freigesetzt. Innerhalb dieser vier Stunden wurde kein Plateau erreicht und der Transfer schien noch nicht gänzlich abgeschlossen zu sein. TPA- und Q10- beladene Partikel zeigten auch in diesem Akzeptormedium keine Veränderung in ihrer $T_{K_{rist}}$ und somit auch keine Freisetzung innerhalb des Untersuchungszeitraums.

4.2.5.6 Freisetzungsuntersuchungen in Schweineblut

Um die DSC-Methode im Hinblick auf realistische und physiologische Bedingungen noch weiter zu optimieren, wurden Freisetzungsuntersuchungen mit Schweineblut als Akzeptormedium durchgeführt. Verglichen mit Serum befinden sich in Vollblut zusätzliche lipophile Komponenten wie beispielsweise Erythrozyten und andere Zellbestandteile, die als Akzeptoren für den freigesetzten lipophilen Wirkstoff fungieren können.

Insgesamt wurde eine etwas höhere Freisetzungsmenge von FB in Schweineblut als in Schweineserum gefunden, während für die anderen Wirkstoffe (OL, TPA, Q10) keine Unterschiede festgestellt werden konnten (Abbildung 4-24). Die unbeladenen Kontroll-Partikel zeigten keine Änderung ihres Kristallisationsverhaltens innerhalb des Untersuchungszeitraumes.

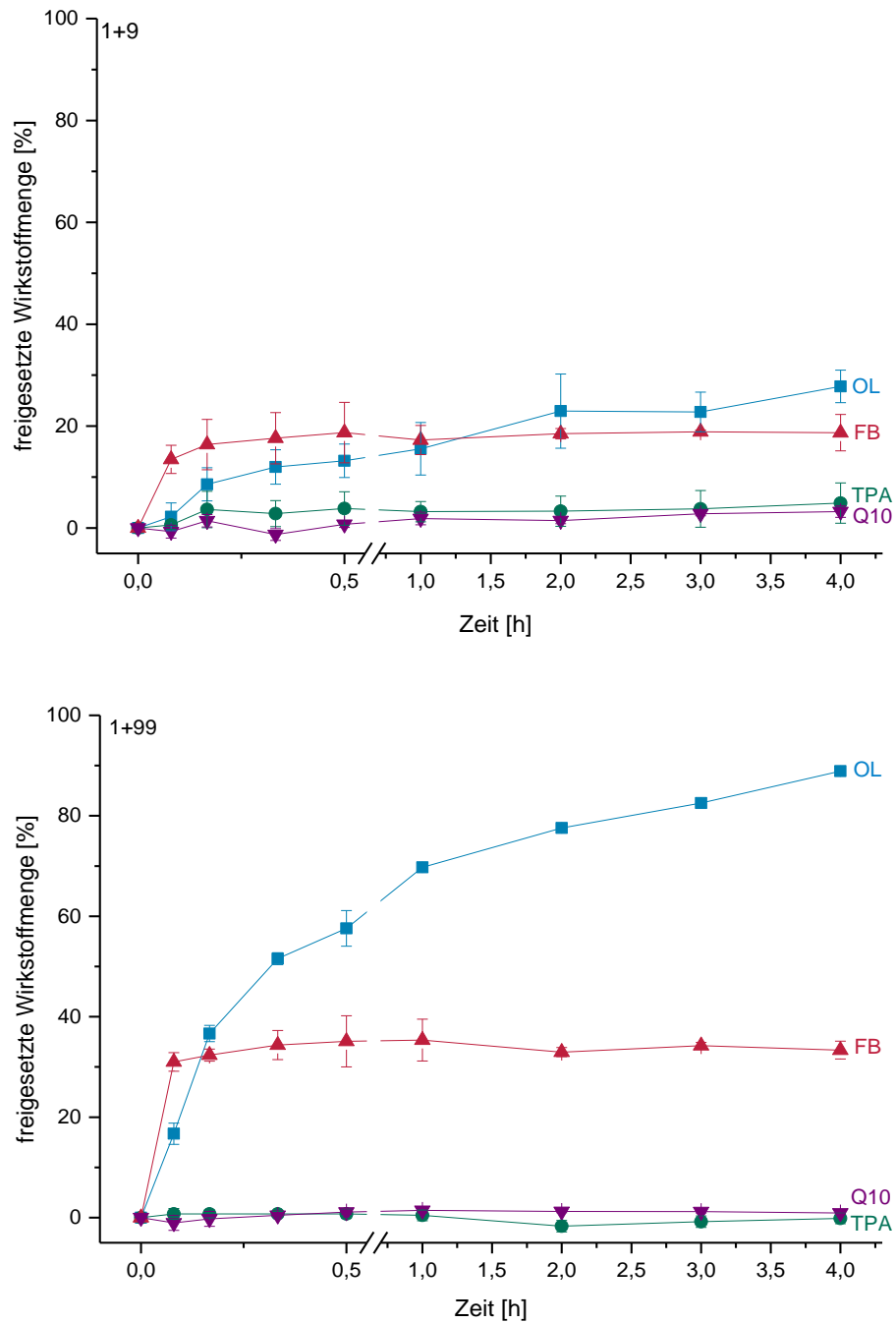


Abbildung 4-23: Ergebnisse der Freisetzung von Fenofibrat (FB), Orlistat (OL), α -D-Tocopherolacetat (TPA) und Ubidecarenon (Q10) aus TM-Nanopartikeln in Schweineserum in zwei Mischungsverhältnissen (oben 1+9, unten 1+99) bei 25 °C über 24 Stunden (\pm SD, $n=3$ Freisetzungsexperimente).

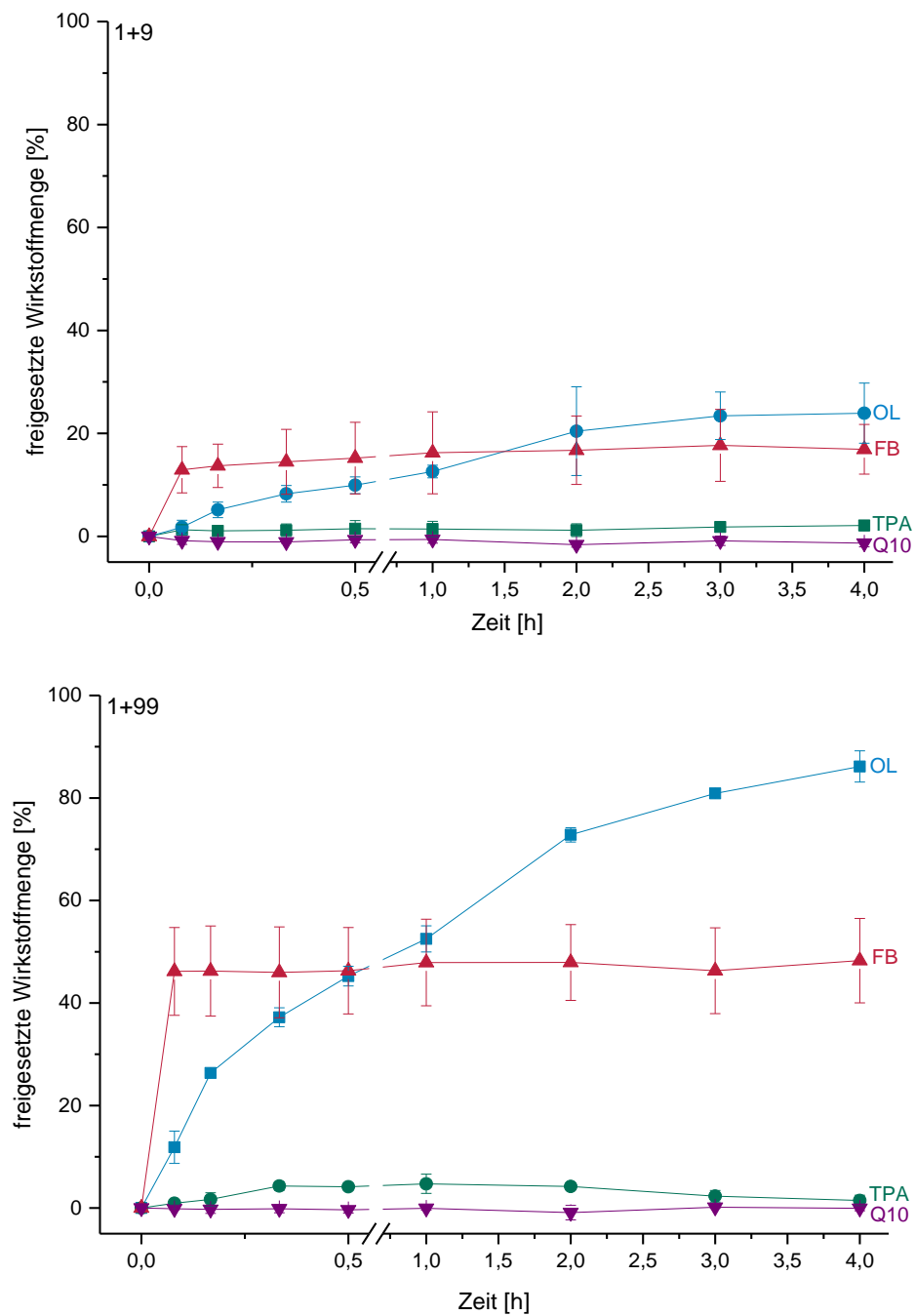


Abbildung 4-24: Ergebnisse der Freisetzung von Fenofibrat (FB), Orlistat (OL), α -D-Tocopherolacetat (TPA) und Ubidecarenon (Q10) aus TM-Nanopartikeln in Schweineblut in zwei Mischungsverhältnissen (oben 1+9, unten 1+99) bei 25 °C über 24 Stunden (\pm SD, $n = 3$ Freisetzungsexperimente).

4.2.5.7 Untersuchungen zum Einfluss des Wirkstoff-Verteilungsgleichgewichtes auf die Freisetzung

Insgesamt wurde in den Freisetzungsuntersuchungen mit Schweineserum und Schweineblut signifikant weniger Wirkstoff freigesetzt als in den Untersuchungen mit einer Rapsöl-Nanoemulsion. Dies könnte zum einen daran liegen, dass in Serum und Blut nicht ausreichend lipophile Akzeptoren für den Wirkstofftransfer verfügbar sind. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass der Transfer durch Serum- bzw. Blut-Komponenten behindert wurde, zum Beispiel durch die Bildung einer Proteinkorona um die Partikel [137,138].

Um das zu Grunde liegende Phänomen näher zu beleuchten, wurde die Freisetzung von FB aus TM-Nanopartikeln in zwei verschiedenen Akzeptorsystemen untersucht: es wurden sowohl reines Schweineserum als auch mit Rapsöl-Nanoemulsion vermisches Schweineserum (Mischungsverhältnis 1+1) als Akzeptor verwendet. FB wurde, wie erwartet, nur zu ca. 30 % innerhalb der ersten Minuten ins Schweineserum freigesetzt (Abbildung 4-25). In eine Mischung von 50 % Rapsöl-Nanoemulsion und 50 % Schweineserum erfolgte hingegen eine schlagartige Freisetzung von annähernd 100 % des Wirkstoffs. Für diese Beobachtung könnte sowohl ein geringer Anteil an verfügbaren Akzeptoren im Serum als auch eine die Freisetzung störende Proteinkorona um die Partikel verantwortlich sein. Daher wurde in einem weiteren Experiment während einer Freisetzungsuntersuchung von FB-beladenen Partikeln in Schweineblut (Mischungsverhältnis 1+9) nach vier Stunden zusätzlich Rapsöl-Nanoemulsion zugefügt (Mischungsverhältnis 1+1). Vor dem Zusatz wurde ein freigesetzter Wirkstoffanteil von unter 20 % detektiert. Nach Zugabe der zusätzlichen lipophilen Akzeptoren stieg der freigesetzte Anteil schlagartig an und es wurde ein Maximalwert von nahezu 100 % erreicht (Abbildung 4-26). Die Ergebnisse dieser beiden Experimente lassen die Schlussfolgerung zu, dass der Wirkstofftransfer hauptsächlich durch die Menge der Serum- bzw. Blutbestandteile beeinflusst wird. Denn wenn die Freisetzung des Wirkstoffs durch zum Beispiel entstehende Proteinhüllen behindert gewesen wäre, wäre der Anteil an freigesetztem Wirkstoff durch die Zugabe von weiteren lipophilen Akzeptoren nicht angestiegen (Abbildung 4-26). Stattdessen scheint die Freisetzung der Wirkstoffe einem Verteilungsgleichgewichts-gesteuertem Prozess zwischen Donor und Akzeptor zu unterliegen: denn je mehr lipophile Akzeptoren vorhanden waren, desto mehr Wirkstoff wurde aus den TM-Partikeln-freigesetzt.

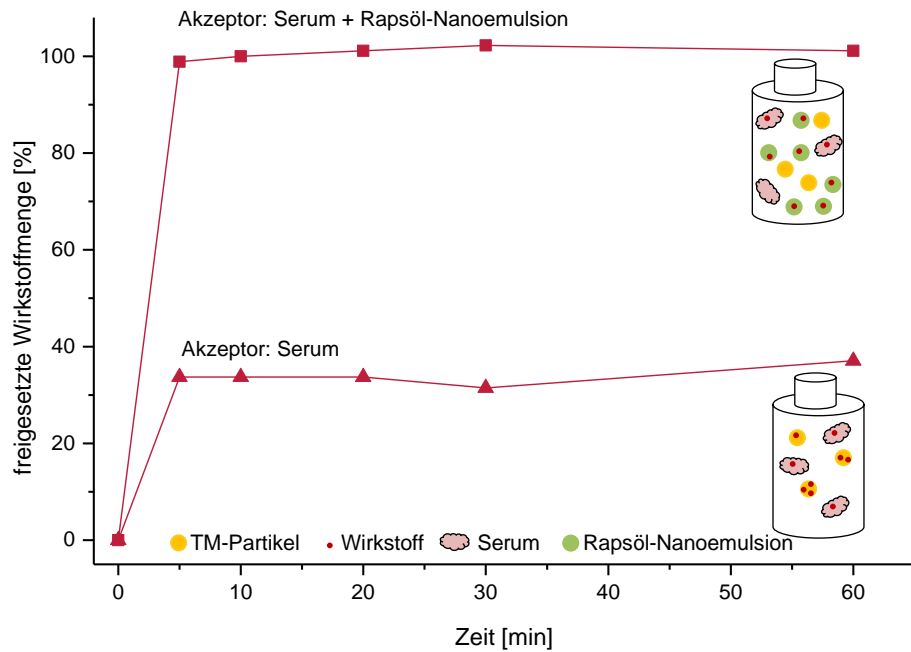


Abbildung 4-25: Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchungen von Fenofibrat aus TM-Nanopartikeln in zwei verschiedenen Akzeptorsystemen: Serum und mit Rapsöl-Nanoemulsion vermisches Serum (1+1) über eine Stunde bei 25 °C inkubiert.

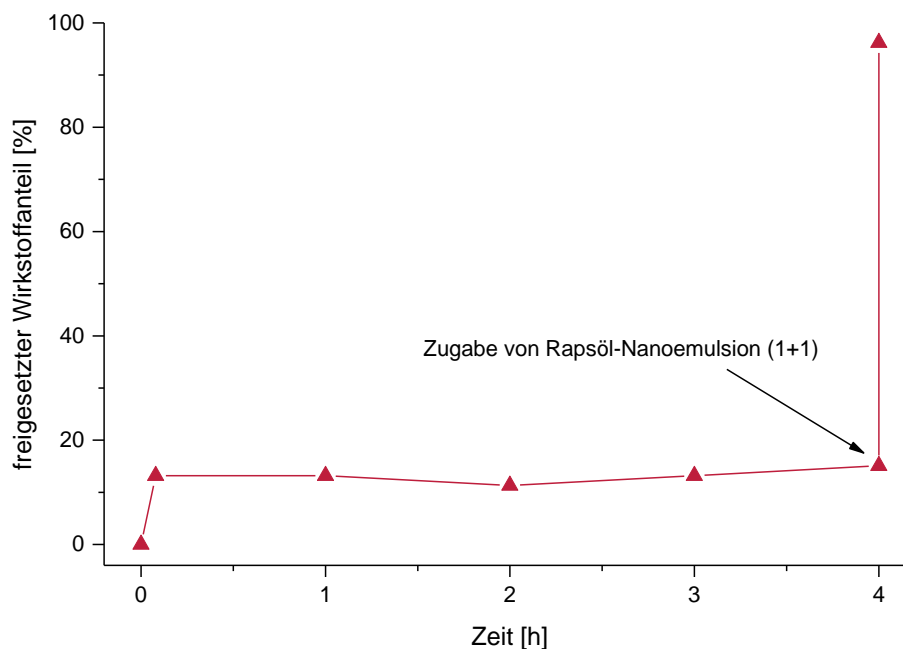


Abbildung 4-26: Freisetzung von Fenofibrat in Schweineblut (1+9) mit Zugabe von Rapsöl-Nanoemulsion (1+1) als zusätzliche lipophile Akzeptoren am Ende des Experiments ($n=1$ Freisetzungsexperiment).

4.2.5.8 Weitere Anwendungsmöglichkeiten der DSC-Methode: Untersuchung des Lipid-Transfers

Bei der Auswahl von geeigneten lipophilen Matrices für ein lipidbasiertes Akzeptorsystem wurde auch Miglyol 812 aufgrund seiner geringen Oxidationsempfindlichkeit untersucht. Es blieb bei den ausgewählten Messbedingungen flüssig und zeigte keine Phasenveränderung, wodurch es grundsätzlich geeignet erschien. Unter den gleichen Bedingungen wie die TM-Nanopartikel wurden Pol 407-stabilisierte Miglyol 812-Nanopartikel (ER23-M) hergestellt. Diese wurden mit unbeladenen Pol 407-stabilisierten TM-Donorpartikeln (ER23) vermischt [1+1] und die Änderung der T_{Krit} über die Zeit beobachtet. Die Thermogramme (Abbildung 4-27) zeigten aufgrund der erheblichen Veränderungen des Kristallisationsereignisses deutlich eine starke Interaktion zwischen TM- und Miglyol 812-Partikeln. Die ersten sechs Proben wurden nur bis 0 °C vermessen, anschließend erfolgte die Anpassung der Messungen bis -10 °C. Durch Analyse der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung konnte gezeigt werden, dass die Partikel stabil waren und die Veränderung der Kristallisationseigenschaften nicht aus Fusion und Partikelgrößenwachstum resultierten (Abbildung 4-28).

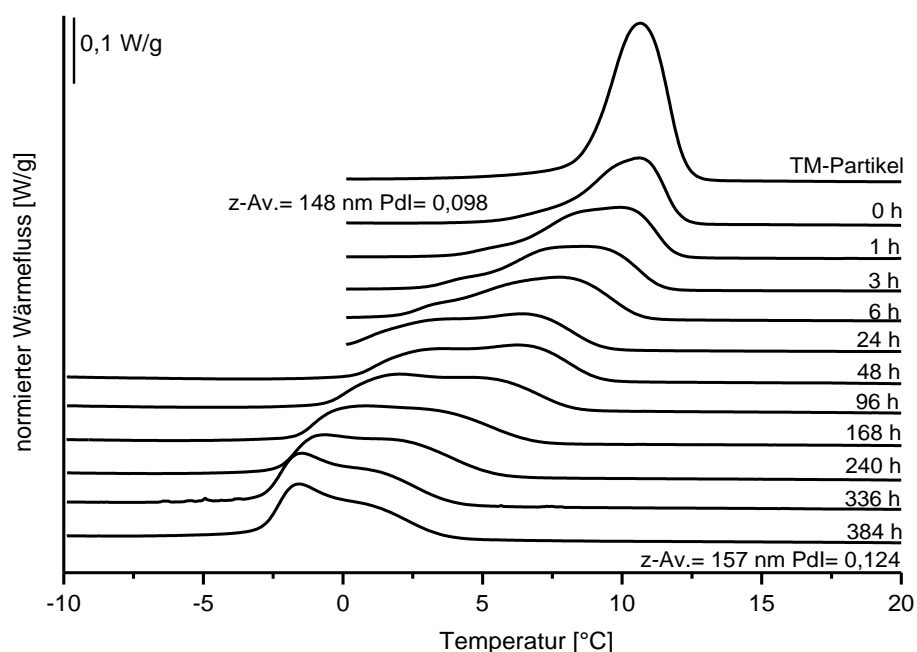


Abbildung 4-27: Kristallisationsverhalten von TM-Nanopartikeln gemischt mit Miglyol 812-Nanopartikeln, jeweils mit Pol 407 stabilisiert. Das Mischungsverhältnis betrug 1+1. Die Partikelgrößenmessung wurde mittels PCS direkt nach Vermischen der Partikel und nach 384 Stunden durchgeführt.

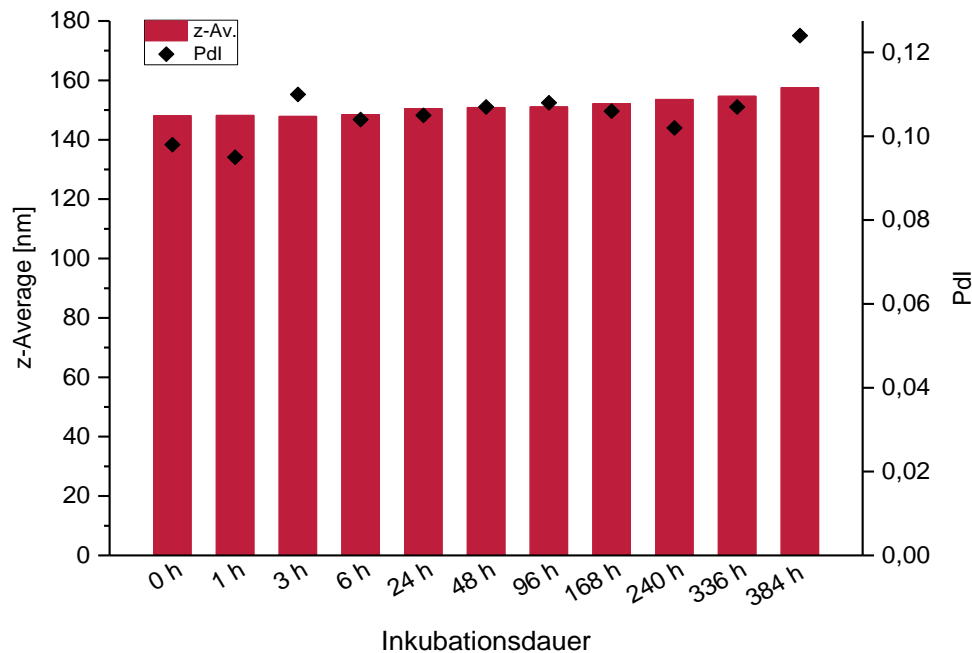


Abbildung 4-28: PCS-Ergebnisse der 1+1 Mischung von TM-Nanopartikeln mit Miglyol 812-Nanopartikeln über 384 Stunden. Beide Dispersionen sind mit Pol 407 stabilisiert.

Vielmehr wurde ein Massentransfer des polareren Miglyol 812 zu den TM-Partikeln vermutet. Durch die Veränderung der Zusammensetzung resultierte dann eine Veränderung der Kristallisationseigenschaften, ohne dass die Partikelgröße zunächst beeinträchtigt wurde. Lipidmoleküle weisen eine begrenzte Löslichkeit in der wässrigen Phase auf, wodurch es zu Diffusionsprozessen und damit einhergehendem Lipidtransfer zwischen Emulsionstropfen kommen kann [139]. Die neu entwickelte DSC-Methode ermöglicht es also auch einen Lipidmassentransfer zwischen flüssigen Lipiden darzustellen und zu untersuchen. Anhand der Ergebnisse zum Lipid-Transfer und aufgrund der erheblichen Beeinflussung des Kristallisationsverhaltens der TM-Partikel musste Miglyol 812 als Basis für lipophile Akzeptorsysteme jedoch ausgeschlossen werden.

4.3 Untersuchungen zu Grenzflächeneffekten bei Trimyristin-Nanopartikeln

Genaue Kenntnisse zu Vorgängen an der Partikelgrenzfläche der Arzneistoffträgersysteme sind sehr wichtig, da es beispielsweise bei der intravenösen Applikation oder im Gastrointestinaltrakt zu Kontakt und somit auch zu Wechselwirkung der Oberflächenstrukturen mit physiologischen Komponenten kommt. Bei den in dieser Arbeit relevanten Systemen können diese Wechselwirkungen sowohl die Integrität und Stabilität der Partikel als auch die Wirkstofffreigabe maßgeblich beeinflussen. So kann die schnelle Adsorption von Opsoninen (beispielsweise Immunglobulin G, Fibrinogen und Komplementfaktor) auf die Nanopartikeloberfläche zu Thrombozytenaggregation und Phagozytenaktivierung führen [140].

Mittels geeigneter Oberflächenmodifikation lässt sich jedoch die Erkennung und die Phagozytose der kolloidalen Träger verhindert. Dies kann zum Beispiel durch die Anlagerung von Pol-Molekülen erreicht werden: durch ihre PEO-Ketten bilden sie eine sterische Barriere um die Partikel und können dadurch eine Adsorption von Opsoninen und die damit verbundene Erkennung durch das Immunsystem verhindern [141]. Die Trägersysteme erhalten dadurch sogenannte „*stealth properties*“ und können so ausreichend lange im Blutstrom zirkulieren, um ihre Zielstruktur ohne frühzeitige Aufnahme durch Macrophagen zu erreichen [142,143]. Durch solche Oberflächenmodifikationen werden auch passive *drug targeting*-Strategien mit bioabbaubaren Matrices realisierbar.

Um den Trägerpartikeln unter realen Bedingungen solche Eigenschaften zu verleihen, ist es notwendig, dass die Oberfläche auch nach Applikation und Verdünnung im Blutstrom ausreichend vom Emulgator bedeckt und geschützt ist. In Vorversuchen zur Entwicklung der neuen Wirkstofffreisetzungsmethode mittels DSC wurde allerdings beobachtet, dass sich durch die Verdünnung mit Wasser bzw. mit anderen Medien das hier verwendete Pol 188 an der Emulsionstropfengrenzfläche in noch unbekannter Weise verändert. Die Experimente zeigten, dass die $T_{K_{rist}}$ der Nanopartikel durch die Verdünnung mit Akzeptorsystemen anstieg, was auf eine mögliche Veränderung der Partikelzusammensetzung hindeutet (Abbildung 4-3). Da eine Wirkstoffbeladung zu sinkenden $T_{K_{rist}}$ der TM-Nanopartikel führt, wurde hier eine Reduktion der Pol-Menge („Abwaschen“) an der Grenzfläche vermutet. Im Hinblick auf die parenterale Anwendungsmöglichkeit sollte daher untersucht werden, ob tatsächlich eine Desorption der Pol 188-Moleküle von der Partikelgrenzfläche durch Verdünnung zu einer Veränderung der $T_{K_{rist}}$ geführt hat. Daraus würde die Gefahr resultieren, dass bei einer Anwendung am Patienten

der Emulgator durch die Verdünnung im Blut von der Partikeloberfläche desorbiert und so keine ausreichende Stabilisierung mehr möglich ist. Demzufolge könnten die Partikel zu größeren Partikeln koaleszieren und bei Überschreiten einer bestimmten Größe sogar zu Embolien führen. Außerdem würden die Partikel ihre „*stealth properties*“ verlieren, frühzeitig abgebaut bzw. phagozytiert werden und *drug targeting*-Strategien könnten nicht erfolgreich verfolgt werden.

Die im Folgenden beschriebenen Experimente beleuchten dieses Phänomen genauer und untersuchen, ob es sich bei der Änderung der T_{Krit} tatsächlich um eine Desorption handelt oder ob andere Effekte beteiligt sind.

4.3.1 Einfluss des Emulgators auf die Kristallisationstemperatur

Bei Experimenten zur Suche nach einem geeigneten Emulgator zur Stabilisierung der Donorpartikel in den Freisetzungsforschungen (Kapitel 4.2.3) wurde beobachtet, dass durch die Verdünnung mit Wasser die T_{Krit} von Pol 188-stabilisierten Nanopartikeln anstieg. Im Gegensatz dazu führte die Verdünnung der Systeme, die mit anderen Emulgatoren stabilisiert wurden (Pol 407, Tylox, SL und PL/SGC), zu keiner signifikanten Änderung der T_{Krit} (Abbildung 4-13). Im Vergleich der Charakteristika der verschiedenen Emulgatoren fiel auf, dass Pol 188 eine sehr hohe CMC aufweist (Tabelle 3-2), sodass die Moleküle in den hier verwendeten Konzentrationen frei und nicht in Mizellen vorlagen. Die Verdünnung des Systems führte, abhängig vom Verdünnungsverhältnis, zu Veränderungen der Monomerenkonzentration in der wässrigen Phase. Das entstandene Konzentrationsgefälle könnte dementsprechend die Pol 188-Moleküle dazu veranlasst haben, die Partikelgrenzfläche zu verlassen, um ein neues Emulgator-Gleichgewicht zwischen Partikelgrenzfläche und wässriger Phase auszubilden (Abbildung 4-29).

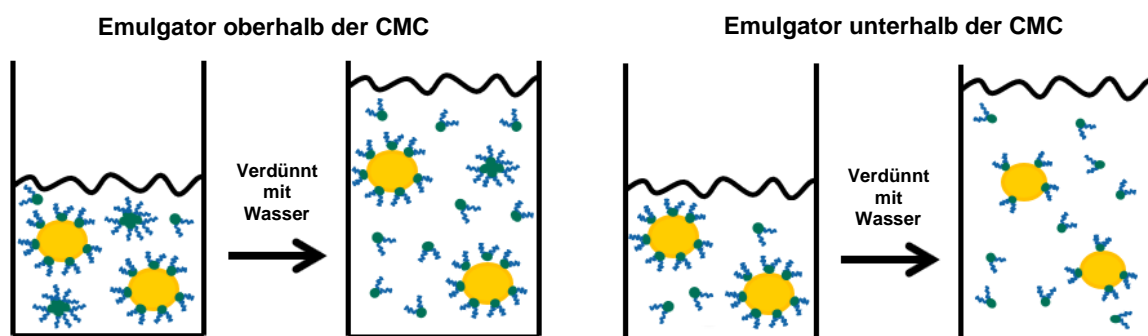


Abbildung 4-29: Schematische Darstellung zu Überlegungen der möglichen Vorgänge an der Grenzfläche von TM-Partikeln bei Verdünnung mit Wasser, wenn der verwendete Emulgator unterhalb bzw. oberhalb seiner CMC eingesetzt wurde.

Die alternativen Emulgatoren (Pol 407, Tylox, SL, SGC) weisen hingegen sehr viel niedrigere CMC-Werte auf [105,120,121,144–147] und da sie in Konzentrationen oberhalb ihrer CMC eingesetzt wurden, bildeten sie in der wässrigen Phase Mizellen. Die Selbstaggregation der eingesetzten Phospholipide in der wässrigen Phase führt zur Ausbildung von Vesikeln, sogenannten Liposomen, die aus Phospholipid-Doppelschichten mit unterschiedlicher Größe und Lamellenzahl bestehen können [148]. Bei einer Verdünnung des Systems können sich nun die Mizellen auflösen beziehungsweise die vorhandenen Monomere dazu dienen, um das gestörte Gleichgewicht wiederherzustellen, ohne dass Emulgatormoleküle von der Partikelgrenzfläche dafür abgezogen werden müssen. Dadurch bleibt die Zusammensetzung der Partikel unverändert und die T_{Krist} konstant. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass es zu keiner Veränderung der T_{Krist} kam, wenn eine Pol 188-stabilisierte TM-Emulsion mit einer Lösung verdünnt wurde, die genau die gleiche Pol-Konzentration aufweist wie die wässrige Phase der Dispersion. Dies wurde durch eine Dialyse der Dispersion und anschließender Verdünnung mit der Dialyselösung erreicht (Abbildung 4-4). Da es durch eine derartige Verdünnung zu keiner Störung des Emulgatorgleichgewichts kommt, ist auch keine Desorption der Pol-Moleküle von der Partikeloberfläche zu erwarten und folglich bleibt die T_{Krist} unverändert. Bei der Pol 407-stabilisierten Dispersion wurde allerdings in den höheren Verdünnungsschritten ebenfalls eine Emulgatorkonzentration unterhalb der CMC erreicht und dennoch keine signifikante Änderung der T_{Krist} beobachtet. Eine Erklärung dafür könnte der größere lipophile Block (PPO-Ketten) des Pol 407 (~ 65 Einheiten) im Vergleich zum Pol 188 (~ 29 Einheiten) sein (Abbildung 4-17): kurze PPO-Ketten adsorbieren in kleinen Schleifen an hydrophoben Oberflächen, während sich lange PPO-Ketten aufgrund verstärkter Kohäsionskräfte zwischen den seitlichen Methylgruppen knäulen und somit der Platzbedarf auf der Oberfläche zunimmt [109,149,150]. Daher scheinen die Pol 407-Moleküle stärker in der Grenzfläche verankert zu sein [110], sodass sie nicht zur Gleichgewichtseinstellung desorbieren können.

Zusätzlich wurde beobachtet, dass die T_{Krist} der mit Pol 407-stabilisierten TM-Nanopartikel stets niedriger war als die T_{Krist} der Pol 188-stabilisierten TM-Partikel, die in gleicher Weise und mit vergleichbarer Größe hergestellt wurden. Auch diese Beobachtung stützt die oben vorgestellte Hypothese, dass die Pol 407-Moleküle tiefer in der Partikelgrenzfläche verankert und dadurch die T_{Krist} geringer ist.

Abbildung 4-30 gibt eine Übersicht über die Konformation adsorbierter Poloxamere mit steigender PPO-Kettenlänge.

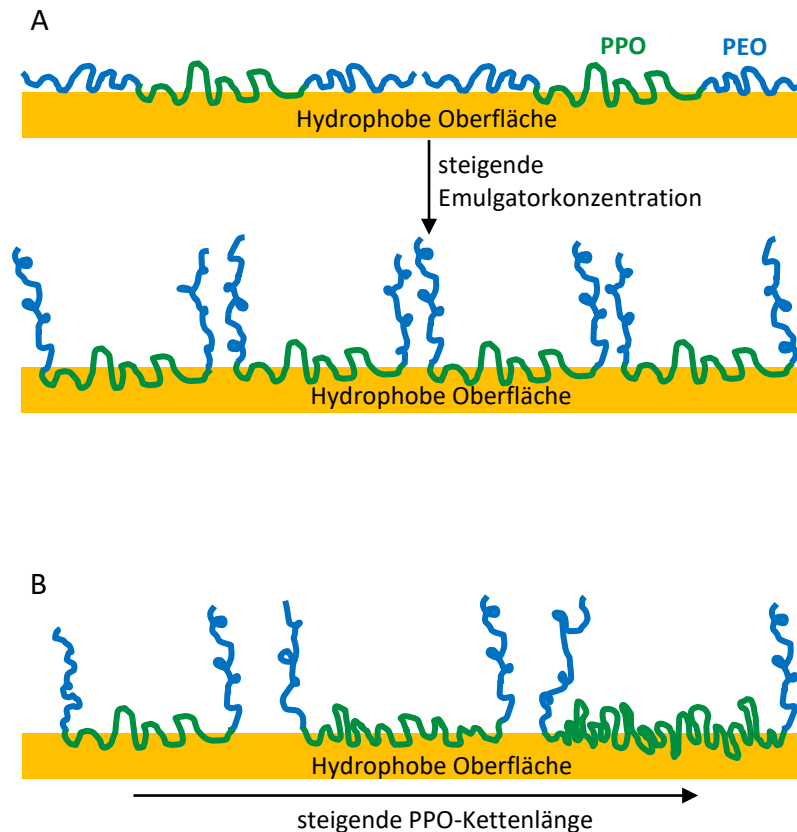


Abbildung 4-30: Übersicht der Konformation adsorbierter PEO-PPO-PEO-Blockcopolymere an festen hydrophoben Oberflächen. A=Konformationsänderung mit steigender Emulgatorkonzentration. B=Konformation mit steigender PPO-Kettenlänge. Nach [149].

4.3.2 Einfluss der Glycerolkonzentration auf das Kristallisationsverhalten

Zusätzlich sollte auch ein möglicher Einfluss des zur Isotonisierung enthaltenen Glycerols auf die T_{Krist} untersucht werden: dazu wurden TM-Donorpartikel mit unterschiedlichen Emulgatoren (Pol 188, Pol 407, Tylox, PL/SGC) ohne Glycerol hergestellt und anschließend mit steigenden Anteilen von Glycerol versetzt. Die Zugabe von Glycerol (0,5-20 % bezogen auf den Gesamtansatz) führte bei den Pol 188-stabilisierten TM-Nanopartikeln zu einem Absinken der T_{Krist} (Abbildung 4-31). Durch PCS-Messungen konnte eine Veränderung der T_{Krist} bedingt durch die Änderung der Partikelgröße ausgeschlossen werden (Abbildung 4-32). Die mit den anderen Emulgatoren (Pol 407, Tylox, PL/SGC) stabilisierten TM-Partikel zeigten keine Veränderung der T_{Krist} nach Glycerol-Zusatz. Die erhaltenen Ergebnisse deuteten auf eine spezifische Interaktion zwischen Pol 188 und Glycerol hin, da dieses Phänomen nur bei den Pol 188-stabilisierten Partikeln zu beobachten war. Aufgrund der sinkenden T_{Krist} wurde vermutet, dass sich die Partikelzusammensetzung durch den Zusatz von Glycerol änderte, vergleichbar mit einer Abnahme der T_{Krist} durch Wirkstoffbeladung [6].

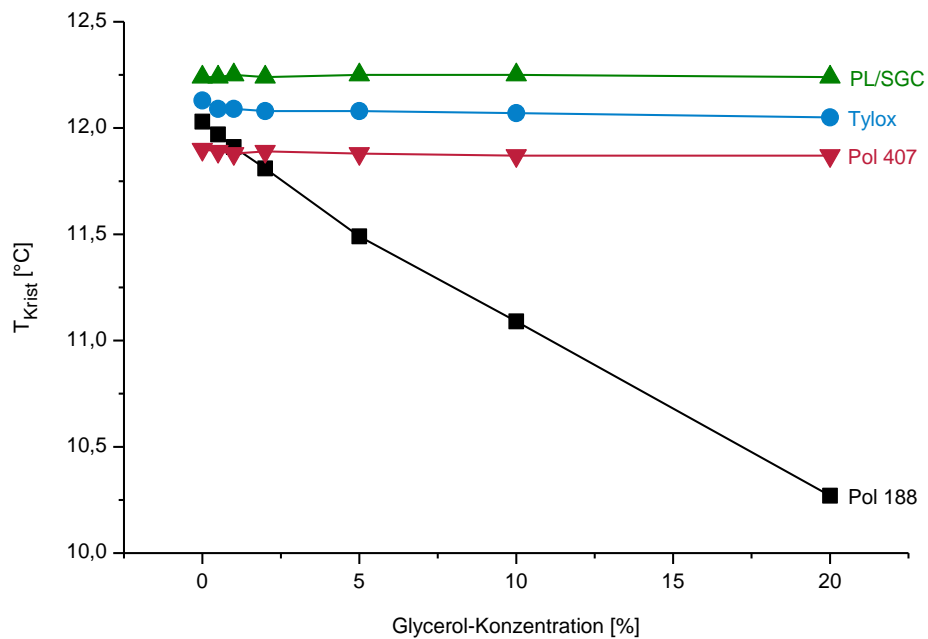


Abbildung 4-31: Einfluss von verschiedenen Glycerol-Konzentrationen auf die T_{Krist} von TM-Nanodispersionen, die entweder mit Poloxamer 188 (Pol 188), Lipoid S100 und Natriumglycocholat (PL/SGC), Poloxamer 407 (Pol 407) oder Tyloxapol (Tylox) stabilisiert sind.

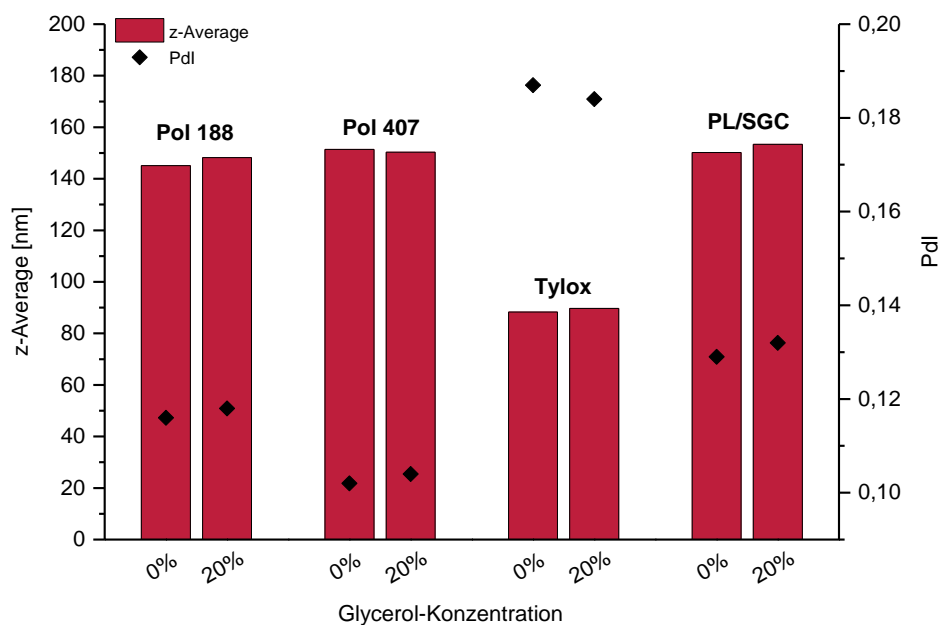


Abbildung 4-32: PCS-Ergebnisse der TM-Nanodispersionen, die entweder mit Poloxamer 188 (Pol 188), Lipoid S100 und Natriumglycocholat (PL/SGC), Poloxamer 407 (Pol 407) oder Tyloxapol (Tylox) stabilisiert wurden. Die Partikel wurden jeweils ohne Glycerol hergestellt und die Partikelgröße vor und nach Zusatz von 20 % Glycerol vermessen.

Da Glycerol aber ein sehr polares Molekül darstellt, wurde es vermutlich nicht selbst in die hydrophoben Partikel inkorporiert, sondern es interagierte vielmehr mit den an der Partikelgrenzfläche adsorbierten Pol 188-Molekülen. Möglicherweise wurden diese dabei tiefer in die Partikel „hineingedrückt“ und es resultierte eine Erniedrigung der T_{Krist} .

Auffällig war, dass die Glycerolzugabe auf die Pol 407-stabilisierten Partikel keinen Einfluss zu haben schien. Dies könnte zum einen damit erklärt werden, dass Glycerol die CMC von Blockcopolymeren senkt [151], wodurch die sowieso schon sehr niedrige CMC des Pol 407 im Vergleich zum Pol 188 (Tabelle 3-1) weiter abfällt. Daher würden nur wenig freie Monomere zur Verfügung stehen, die an die Partikelgrenzfläche adsorbieren könnten. Zum anderen weist Pol 407 einen größeren lipophilen PPO-Block auf, wodurch das Molekül stärker in der Grenzfläche verankert ist und sich möglicherweise nicht so leicht von Fremdmolekülen beeinflussen lässt [133].

Der exakte Mechanismus, wie Glycerol die Konformation des Pol 188 beeinflusst und so zu einer Änderung der T_{Krist} führt, ist zurzeit noch nicht vollständig verstanden und es sind weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung der Vorgänge an der Partikelgrenzfläche nötig.

Für die nachfolgenden Untersuchungen zum Grenzflächenverhalten des Pol 188 wurde Glycerol aus der Formulierung ausgeschlossen, um weitere Einflüsse auf die T_{Krist} zu vermeiden.

4.3.3 Indirekte Quantifizierung von gebundenem Poloxamer mittels Dialyse

Zur Bestätigung der Hypothese, dass die beim Verdünnen beobachteten Effekte auf eine Gleichgewichtseinstellung zwischen wässriger Phase und Partikeloberfläche zurückzuführen sind, sollte untersucht werden, ob die Menge an gebundenem Pol 188 an der Grenzfläche der TM-Partikel mit der T_{Krist} korreliert.

Zur genaueren Untersuchung der Phänomene an der Partikelgrenzfläche wurde eine Ausgangs-TM-Nanoemulsion (ER20, TM 10 %, Pol 188 5 %) hergestellt und mittels Dialyse auf jeweils verschiedene Pol 188-Konzentrationen in der Wasserphase eingestellt. Die Namensgebung der einzelnen Proben bezieht sich hierbei auf die Pol-Konzentration der jeweils verwendeten Dialyselösung. Durch Ausbildung eines Konzentrationsgleichgewichts zwischen der wässrigen Phase der Nanoemulsion und des Dialysemediums wurde davon ausgegangen, dass der Emulgatorgehalt nach erfolgter Dialyse in der wässrigen Phase der Nanoemulsion und in der Dialyselösung identisch ist. Zur Bestimmung der benötigten Zeitdauer der Dialyse, die für eine Gleichgewichtseinstellung notwendig ist, wurden mit Wasser gefüllte Dialyseschläuche jeweils in eine 1 %ige und in eine 5 %ige Pol 188-Lösung eingebracht. Zu bestimmten Zeitpunkten

wurden Proben aus den Dialyseschläuchen gezogen und die Änderung der Emulgatorkonzentration über den Brechungsindex verfolgt. Konstante Werte der Brechungsindices wurden nach ca. 120 Stunden erreicht und zeigten den Gleichgewichtszustand an.

PCS-Messungen belegten, dass die Systeme auch nach der Dialyse noch stabil waren, mit Ausnahme der gegen reines Wasser dialysierten Dispersion (ER20_0%). Diese enthielt makroskopisch sichtbare Partikel und die Ergebnisse der DSC-Untersuchungen deuteten auf eine vollständige Auskristallisation der Dispersion hin: Beim Aufheizen des Systems zeigte sich ein scharf begrenzter Peak und es fehlte das multiple, hoch strukturierte und für fein dispergierte TM-Nanopartikel charakteristische Schmelzsignal [152]. Da die Partikel ursprünglich mit ausreichend Emulgator hergestellt wurden, deuteten auch diese Ergebnisse auf dynamische Vorgänge an der Partikelgrenzfläche hin: angetrieben durch die Ausbildung eines neuen Konzentrationsgleichgewichts desorbierten die Pol-Moleküle vermutlich von der Partikelgrenzfläche und führten so zu einer Emulgatorkonzentration, die nicht ausreichend war, um die Partikel langfristig zu stabilisieren. Die Pol 188-Menge in dem zugänglichen Dialysemedium wurde nach abgeschlossener Dialyse sowohl über Brechungsindex anhand vorheriger Kalibrierung mit Pol-Lösungen bekannter Konzentrationen als auch über NMR

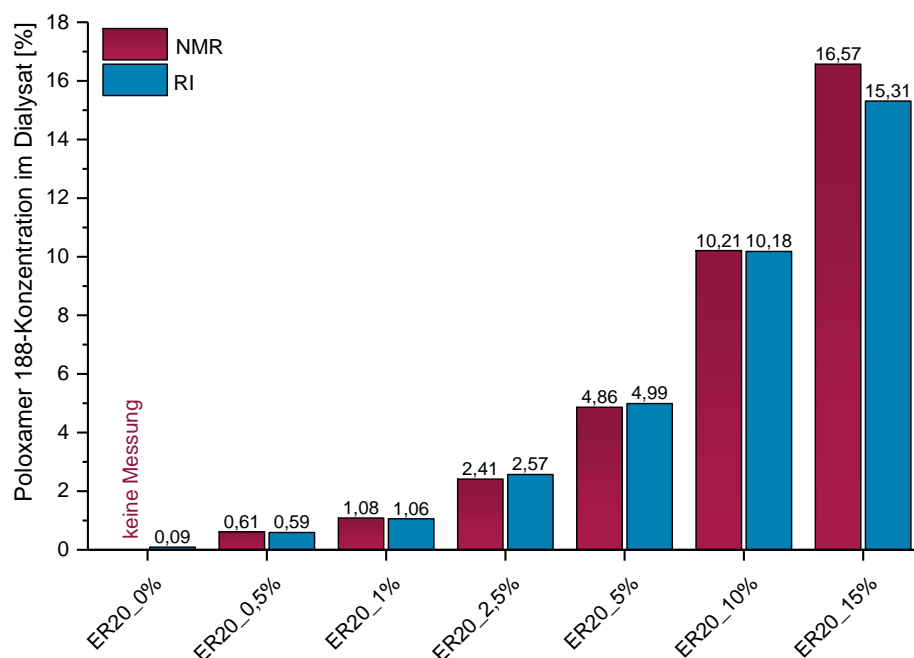


Abbildung 4-33: Vergleich der Quantifizierung von Pol 188 in der Dialyselösung mittels NMR und Brechungsindex nach Dialyse von TM-Nanopartikeln mit Emulgator-Lösungen unterschiedlicher Konzentration. Die Probenbezeichnung beinhaltet die interne Partikelcharge und die Pol-Konzentration der jeweils verwendeten Pol-Lösung (n=1).

quantifiziert und verglichen (Abbildung 4-33). Die Quantifizierung des Pol 188-Gehalts über den Brechungsindex erwies sich als gut vergleichbar mit den Ergebnissen der NMR-Messung und bot eine einfache und schnell durchführbare Alternative zur aufwendigen NMR-Analyse. Die einzige Ausnahme stellten die Ergebnisse der ER20_15% Dispersion dar, die eine größere Diskrepanz der beiden Analyse-Verfahren zeigten.

Da es sich hier um Experimente mit nur einer Stichprobe handelt, wird die laut Brechungsindex-Bestimmung scheinbar erhöhte Pol 188-Konzentration hier nicht näher betrachtet und diskutiert. Für eine genaue Analyse des gebundenen Pol-Gehalts an der Grenzfläche wäre eine Separation der Emulsionstropfen von ihrer wässrigen Phase notwendig, deren Durchführung aber durch die Partikelgröße im Nanometerbereich erschwert ist. Daher wurde anfänglich nur eine indirekte Bestimmung der Menge an gebundenem Pol 188 an der Partikelgrenzfläche durchgeführt. Durch die Einstellung des Emulgatorgleichgewichts während der Dialyse konnte angenommen werden, dass die Konzentration von Pol 188 in der wässrigen Phase der Dispersion (Pol wässrige Phase) annähernd dieselbe ist wie im wässrigen Dialysemedium. Mittels NMR-Messungen konnten dann sowohl die Gesamt-Pol-Konzentration in der Emulsion als auch die Emulgator-Konzentration im entsprechenden Dialysemedium nach erfolgter Dialyse quantifiziert werden. Für eine bessere Annäherung wurde die ermittelte Menge des Pol 188 im entsprechenden Dialysemedium um den ebenfalls mittels NMR quantifizierten Lipidanteil in der Emulsion korrigiert: Dazu wurde der Anteil der Wasserphase (Anteil Wasserphase) anhand der quantifizierten Trimyristin-Menge (Lipid gesamt) in der betreffenden Emulsion berechnet (Gleichung 3).

$$\text{Anteil Wasserphase} = \frac{1000 - \text{Lipid gesamt [mg/ml]}}{1000} \quad [\text{Gleichung 3}]$$

Der Anteil der Wasserphase wurde anschließend mit der ermittelten Menge Pol 188 im Dialysat (Pol wässrige Phase) multipliziert, sodass man die korrigierte Menge Pol 188 im Dialysat (Pol wässrige Phase korr.) erhält, die dem Emulgator-Gehalt eines Wasser-in-Öl-Systems mit dieser Wasserphase und dem ermittelten Lipidgehalt entspräche, allerdings unter Vernachlässigung des Anteils an gebundenem Poloxamer in der Grenzfläche (Gleichung 4).

$$\text{Pol wässrige Phase korr.} = \text{Anteil Wasserphase} \cdot \text{Pol wässrige Phase} \quad [\text{Gleichung 4}]$$

Um nun auf die Menge an gebundenem Pol in der Grenzfläche schließen zu können (Pol GF), erfolgte eine Subtraktion der korrigierten Pol-Menge im Dialysemedium (Pol wässrige Phase korr.) von der für die Emulsion ermittelte Gesamt-Pol-Menge (Pol gesamt) (Gleichung 5).

$$Pol\ GF = Pol\ gesamt - Pol\ wässrige\ Phase \quad [Gleichung\ 5]$$

Im Zuge der NMR-Messungen wurde auch der TM-Gehalt der einzelnen Proben bestimmt. Die Ergebnisse zeigten eine erhebliche Veränderung der TM-Konzentration durch die Dialyse und daher erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit eine Normierung der gebundenen Emulgator-Menge auf die Lipidmenge. Dazu wurden die erhaltenen Werte für die Menge an gebundenem Pol 188 in der Grenzfläche auf den TM-Gehalt (Lipid gesamt) der entsprechenden Dispersion bezogen und als die Menge Pol 188 an 100 mg Lipid gebunden angegeben (Gleichung 6).

$$Pol\ GF(mg/100mg\ Lipid) = \frac{Pol\ gesamt - Pol\ wässrige\ Phase}{Lipid\ gesamt} \cdot 100 \quad [Gleichung\ 6]$$

Insgesamt ist die Vergleichbarkeit durch nicht vollständig zutreffende Annahmen allerdings eingeschränkt: Als Wert für die Dichte des Lipids wurde 1 g/ml angenommen und die Korrektur erfolgt über gravimetrische Berechnung, während die Analyse volumetrisch durchgeführt wurde. Obwohl besonders für hohe Pol-Konzentrationen die Annahmen problematisch sind, da sie die Dichte erheblich beeinflussen, konnten so erste Abschätzungen zur Menge an gebundenem Pol erhalten werden. Die in Abbildung 4-34 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich der Gesamt-Pol-Gehalt der Dispersionen wie erwartet durch die Dialyse und der damit verbundenen Einstellung eines neuen Gleichgewichts verändert hat. Die Menge an gebundenem Pol 188 stieg mit höherer Gesamt-Pol-Konzentration zunächst leicht an (Proben ER20_0,5 %, _1 %, _2,5 %), fiel ab der Probe ER20_5 % allerdings wieder ab. Möglicherweise waren die Dialyse bzw. die Gleichgewichtseinstellung mit den höher konzentrierten Pol-Lösungen noch nicht vollständig abgeschlossen. Durch die hohe Emulgatorkonzentration und die Anwesenheit von Emulsionstropfen könnte die Diffusion der Monomere in den Dialyseschlauch möglicherweise (u.a. aufgrund der gestiegenen Viskosität) verlangsamt gewesen sein, sodass die zuvor ermittelte Zeitspanne für die Gleichgewichtseinstellung nicht ausgereicht haben könnte. Die entsprechenden Vorversuche wurden lediglich mit Lösungen bis maximal 5 % Pol 188 und im Gegensatz zu der eigentlichen Probe ohne Anwesenheit von Partikeln durchgeführt. Auch dies könnte die Geschwindigkeit beeinflusst haben.

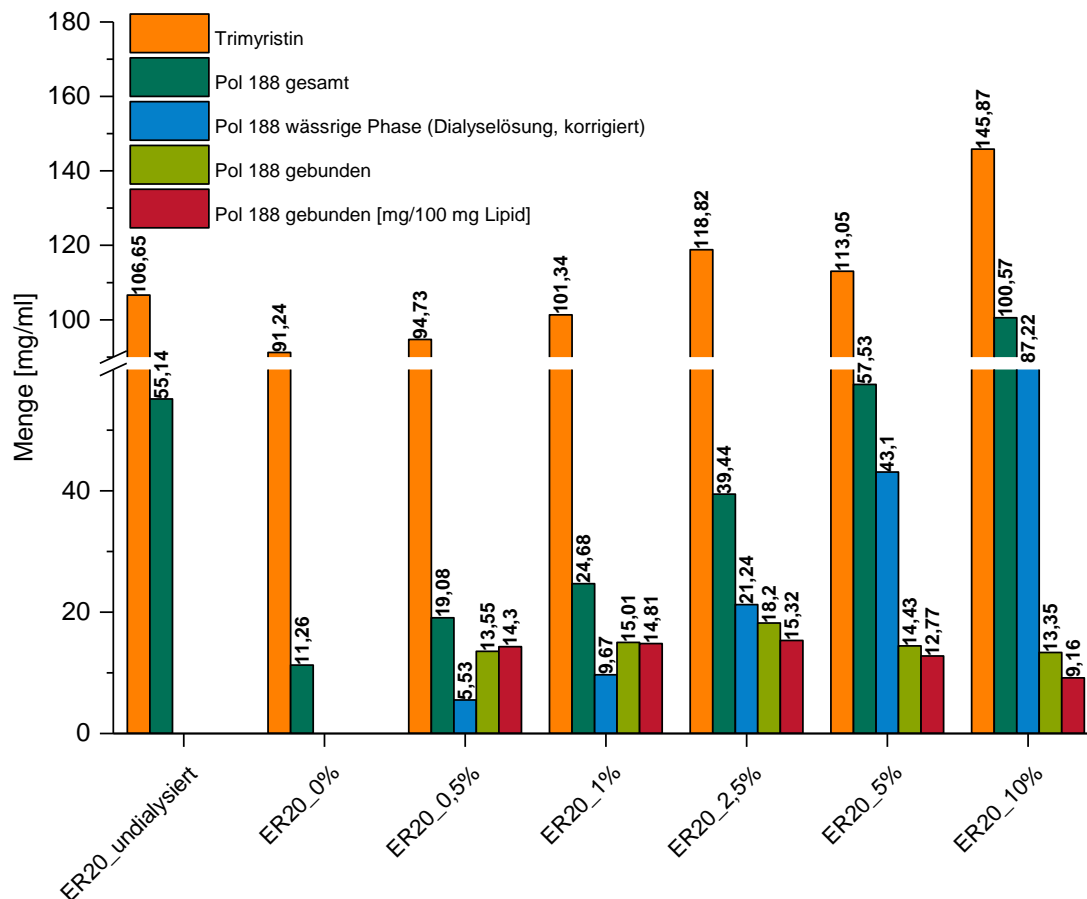


Abbildung 4-34: Gehaltsbestimmung von zuvor dialysierten TM-Nanopartikeln mittels NMR. Dargestellt sind die Werte für Trimyristin (TM), Gesamt-Poloxamer 188 (Pol 188 gesamt), Poloxamer 188 in der wässrigen Phase (Pol wässrige Phase) der Partikel (nur indirekt bestimmt, vermessen wurde die Dialyselösung) und der Poloxamer 188-Gehalt an der Partikelgrenzfläche (Pol 188 gebunden). Dieser wurde theoretisch durch Subtraktion der ermittelten Konzentration des Dialysemediums (Pol wässrige Phase, nach Korrektur des Wasseranteils um den ermittelten Lipidgehalt der entsprechenden Emulsion) vom Gesamt-Poloxamer-Gehalt (Pol gesamt) bestimmt. Zusätzlich wurde die Menge an gebundenem Emulgator auf den Trimyristin-Gehalt normiert und ist als Menge an gebundenem Poloxamer 188 pro 100 mg Lipid (Pol 188 gebunden [mg/100 mg Lipid]) angegeben. Die Probenbezeichnung beinhaltet die interne Partikelcharge und die Pol-Konzentration der jeweils verwendeten Pol-Lösung ($n=1$).

Die unerwarteten Ergebnisse der TM-Quantifizierung zeigten, dass die auf einen geringeren Pol-Gehalt dialysierten Proben nach der Dialyse ca. 10% weniger TM als vorher enthielten, vermutlich aufgrund von osmotisch bedingten Verdünnungsprozessen. Die auf einen höheren Gehalt dialysierten Proben zeigten hingegen einen Anstieg der TM-Konzentration um bis zu 50% nach der Dialyse. Diese Beobachtung könnte möglicherweise auch als Erklärungsansatz für die unvollständige Dialyse dienen: Die teilweise erhebliche Aufkonzentrierung an Lipid im Dialyseschlauch, wahrscheinlich infolge eines osmotisch indizierten Wasserentzugs steht der Diffusion der Pol-Moleküle in den Dialyseschlauch hinein entgegen, wodurch die Gleichgewichtseinstellung verlangsamt würde und so zu einer unvollständigen Dialyse führt. Die Beobachtungen stellen die Annahme, dass die Zusammensetzung des Dialysemediums

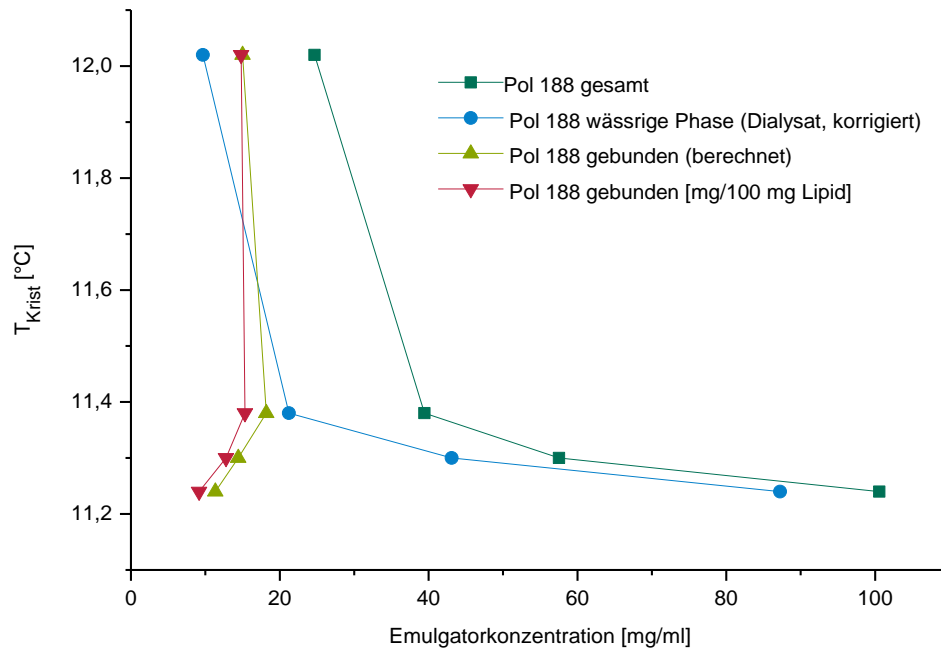


Abbildung 4-35: Korrelation der T_{Krist} mit den verschiedenen Pol 188-Konzentration von TM-Nanopartikeln. Dargestellt sind die Werte für Gesamt-Pol 188 (Pol gesamt), Pol 188 in der wässrigen Phase (Pol wässrige Phase, entspricht der Dialyselösung nach Korrektur um den Lipidgehalt) und der gebundene Pol 188-Gehalt (Pol GF, theoretisch durch Subtraktion der Konzentration des Dialysemediums (Pol wässrige Phase) vom Gesamt-Pol-Gehalt (Pol gesamt) ermittelt, sowie der auf die Lipidmenge normierte Anteil von gebundenem Pol 188 (mg pro 100 mg Lipid) gegen die T_{Krist} . Dargestellt sind nur die Daten der stabilen Partikel.

genau der Zusammensetzung der wässrigen Phase der Dispersionen entspricht, erheblich in Frage. Diese unerwarteten Beobachtungen und die unvollständige Gleichgewichtseinstellung bei der Dialyse erschweren die Interpretation der Ergebnisse und sind daher nur ansatzweise dargestellt worden: Bei Betrachtung der NMR-Ergebnisse unter Einbezug der resultierenden T_{Krist} der dialysierten Proben wurde eine Tendenz erkennbar: je höher die Gesamt-Emulgatorkonzentration des Systems ist, desto niedriger ist die T_{Krist} (Abbildung 4-35). Dieser Zusammenhang scheint bis zur Annäherung an ein Plateaus erkennbar zu sein: Trotz erheblicher Erhöhung der Emulgatorkonzentration resultierten ab ca. 40 mg/ml Emulgatormenge nur noch geringfügige Änderungen in der T_{Krist} . Die Ergebnisse für den gebundenen Anteil des Pol 188 zeigten einen Anstieg der T_{Krist} bei Erhöhung der Emulgatorkonzentration an der Grenzfläche. Auffällig war, dass sich die Emulgatorkonzentration an der Oberfläche der Partikel nur geringfügig änderte, die T_{Krist} aber trotzdem erhebliche Unterschiede zeigte. Dieses Ergebnis ist widersprüchlich zu der Annahme, dass ein steigender Anteil an gebundenem Pol 188 die T_{Krist} erniedrigt.

Insgesamt stellte sich diese Art der Quantifizierung des Pol-Gehalts an der Partikelgrenzfläche als zu unpräzise und die Dialyse als zu fehleranfällig heraus, um signifikante Daten zu erhalten und fundierte Schlussfolgerungen ableiten zu können.

4.3.4 Indirekte Quantifizierung von gebundenem Poloxamer mittels Vivaspin®

Um das langandauernde und störanfällige Dialyseverfahren zur Herstellung von TM-Systemen mit unterschiedlichen Pol-Konzentrationen in der wässrigen Phase zu umgehen, wurde eine Emulsion (ER27: 20 % TM, 10 % Pol 188, z-Av.: 81 nm, PdI: 0,091) hergestellt und mit unterschiedlich konzentrierten Pol-Lösungen 1+19 verdünnt. Die Nomenklatur der Proben beinhaltet die interne Partikelcharge und die Konzentration der jeweils verwendeten Pol-Lösung (angestrebte Pol-Konzentration der wässrigen Phase). Um eine genaue Quantifizierung des Pol-Gehaltes in der wässrigen Phase zu ermöglichen, sollte diese durch Membranzentrifugation mittels Vivaspin® (300 kDa MWCO, 6 ml) von den Emulsionstropfen abgetrennt werden.

4.3.4.1 Vorversuche

Vorversuche mit Wasser ergaben, dass eine Zentrifugation durch die Vivaspins® zu einer Veränderung des Brechungsindex führte: Daraufhin wurde in weiteren Experimenten ermittelt, dass die Vivaspins® vor dem eigentlichen Versuch je dreimal mit bidestilliertem Wasser zentrifugiert werden mussten, um Produktionsreste oder Feuchthaltemittel auszuwaschen. Zur Entfernung des Restspülwassers und zur Vermeidung von Verdünnungen der Proben wurden sie anschließend kurz trocken zentrifugiert. Der quantitative Durchgang des Pol 188 wurde durch die Filtration von Pol 188-Lösungen verschiedener Konzentrationen (0,5 %, 1,25 %, 5 %, 8 %) und die anschließende Analyse des Pol-Gehalts sowohl des Filtrates als auch des Überstandes mittels Brechungsindexmessungen bestätigt. Es kam zu keinem Verlust bzw. zu keiner Aufkonzentrierung des Emulgators durch die Zentrifugation. Um einen Durchgang von TM-Partikeln durch die Membran auszuschließen, wurde nach Filtration der Ausgangs-TM-Nanoemulsion (ER27) das klare Filtrat mittels Evaporator unter Stickstoff eingengt und in der DSC (25-0-85 °C) vermessen. Es konnte kein thermisches Event beobachtet werden. Daher ist davon auszugehen, dass kein oder zumindest nur sehr wenig TM durch die Membran der Vivaspins® gelangte, sodass die Quantifizierung des Pol-Gehalts in der wässrigen Phase über den Brechungsindex nicht verfälscht wurde. Partikelgrößenmessungen mittels PCS belegten außerdem, dass die Partikel nach der Zentrifugation weiterhin stabil waren und es zu keiner Veränderung der Partikelgröße und des PdIs kam.

4.3.4.2 Quantifizierung

Aufgrund der Verdünnung der Proben konnte die wässrige Phase unter den gewählten Bedingungen ohne Probleme abfiltriert werden. Die Filtrate wurden anschließend am Refraktometer vermessen und der Pol-Gehalt anhand einer Kalibriergeraden ermittelt (Anhang A4). Zusätzlich erfolgte eine Quantifizierung der Filtrate und der unfiltrierten Proben mittels NMR. Wie erwartet zeigten die beiden Quantifizierungsmethoden vergleichbare Ergebnisse für den Pol-Gehalt in der wässrigen Phase, wobei die Abweichungen bei den höher konzentrierten Proben größer wurden (Abbildung 4-36). Die Ergebnisse der NMR-Analyse der gesamten Emulsionen und der dazugehörigen Filtrate sind in Abbildung 4-37 dargestellt. Durch den doppelten Versuchsansatz von Probe_1,25% und Probe_7,5% konnte eine gute Reproduzierbarkeit sowohl der Filtration durch die Vivaspins®, als auch der NMR-Messungen gezeigt werden. Die Ergebnisse der gesamten Probe_1,25% konnte leider nicht angegeben werden, da die Messung vergessen wurde und nicht nachgeholt werden konnte. Die Ergebnisse der unverdünnten Ausgangsemulsion konnten ebenfalls nicht ausgewertet werden, da die

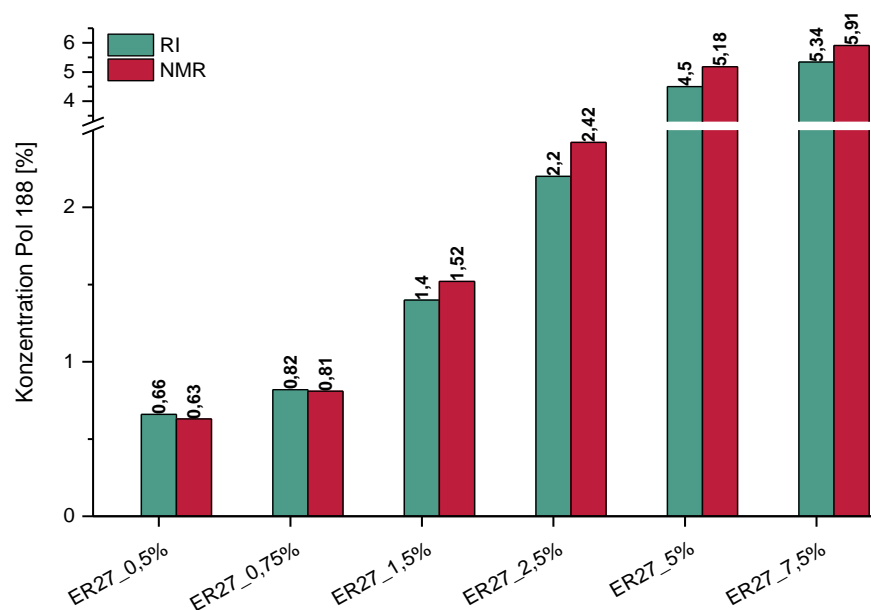


Abbildung 4-36: Vergleich der Ergebnisse einer Pol 188-Konzentrationsbestimmung mittels NMR- (rot) und RI-Methode (grün). Die TM-Nanopartikel wurden 1+19 mit Pol 188-Lösungen verschiedener Konzentrationen verdünnt und anschließend wurde die wässrige Phase mittels Vivaspin® abfiltriert. Die Probenbezeichnung beinhaltet die interne Partikelcharge und die Pol-Konzentration der jeweils verwendeten Pol-Lösung (n=1).

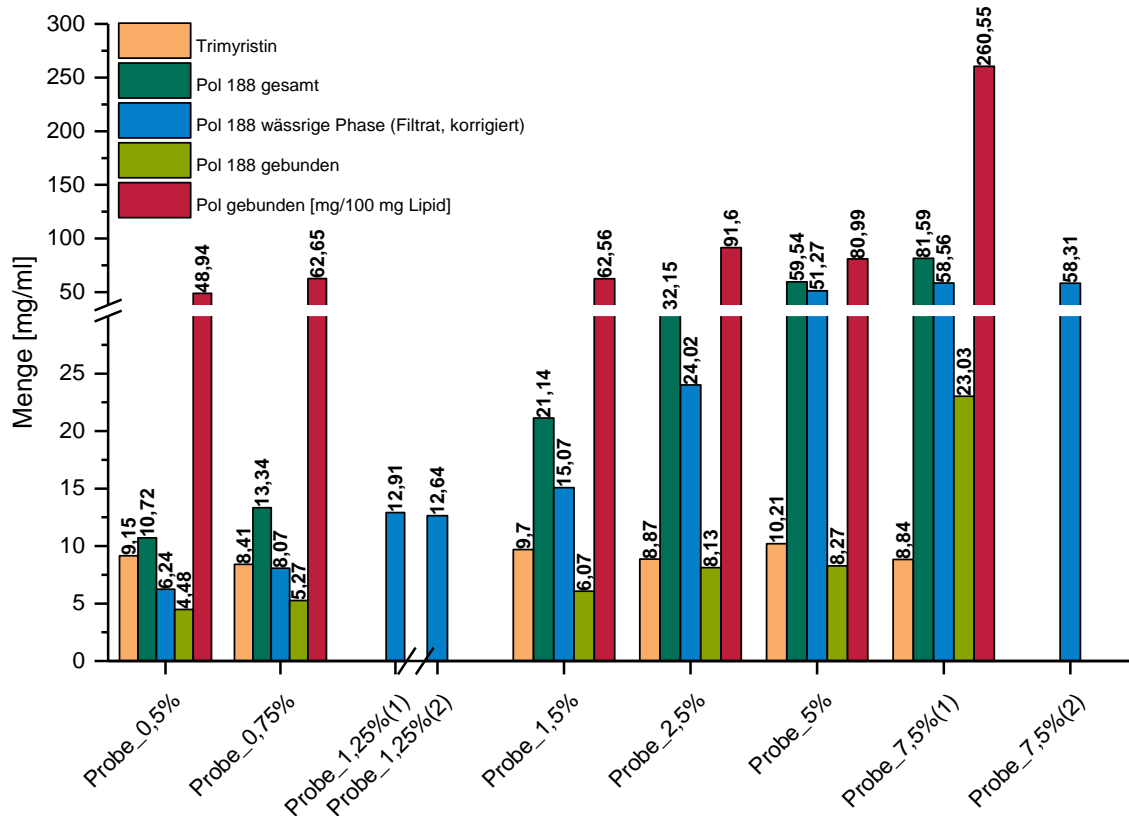


Abbildung 4-37: Ergebnisse der NMR-Gehaltsbestimmung von Trimyristin (TM), Gesamt-Poloxamer 188 (Pol 188 gesamt) und Poloxamer 188 in der wässrigen Phase (Pol 188 wässrige Phase, korrigiert), wobei hier das mittels Vivaspin® abfiltrierte Filtrat vermessen und um den ermittelten Lipidgehalt der entsprechenden Emulsion korrigiert wurde. Der Anteil des an den Partikeln gebundenen Pol 188 (Pol 188 gebunden) wurde durch Subtraktion der Menge von Pol 188 wässrige Phase von der Menge Pol 188 gesamt ermittelt ($n=1$). Die Quantifizierung der eigentlichen „Probe_1,25%“ war nicht möglich, hier wurden lediglich die Filtrate vermessen, wobei die Probe jeweils einzeln filtrierte und einzeln vermessen wurde. „Probe_7,5%“ wurde ebenfalls zweimal filtrierte und quantifiziert, um die Reproduzierbarkeit zu prüfen.

vorbereitete Probe während der Wartezeit auf die NMR-Messung aus unbekannten Gründen auskristallisiert ist und somit keine aussagekräftigen Werte lieferte.

Die Bestimmung des TM-Gehalts ergab einen Lipidgehalt von ca. 1 % in den Proben nach Verdünnung. Allerdings konnten relativ große Schwankungen des Gehaltes von bis zu 20 % beobachtet werden, die auf die Probenvorbereitung zurückgeführt wurden. Es wurden sowohl bei der Verdünnung der Emulsionen mit den Emulgator-Lösungen als auch besonders bei den Vorbereitungen für die NMR-Messungen mit geringen Probenvolumina gearbeitet, wodurch unvollständige Lösung oder Überführung diese Abweichungen bedingt haben könnten. Im Gegensatz zu den Dialyseversuchen kam es bei der Probenvorbereitung durch die Verdünnung allerdings zu wesentlich weniger Veränderung in der Partikelzusammensetzung, sodass die Ergebnisse dennoch recht gut miteinander vergleichbar waren.

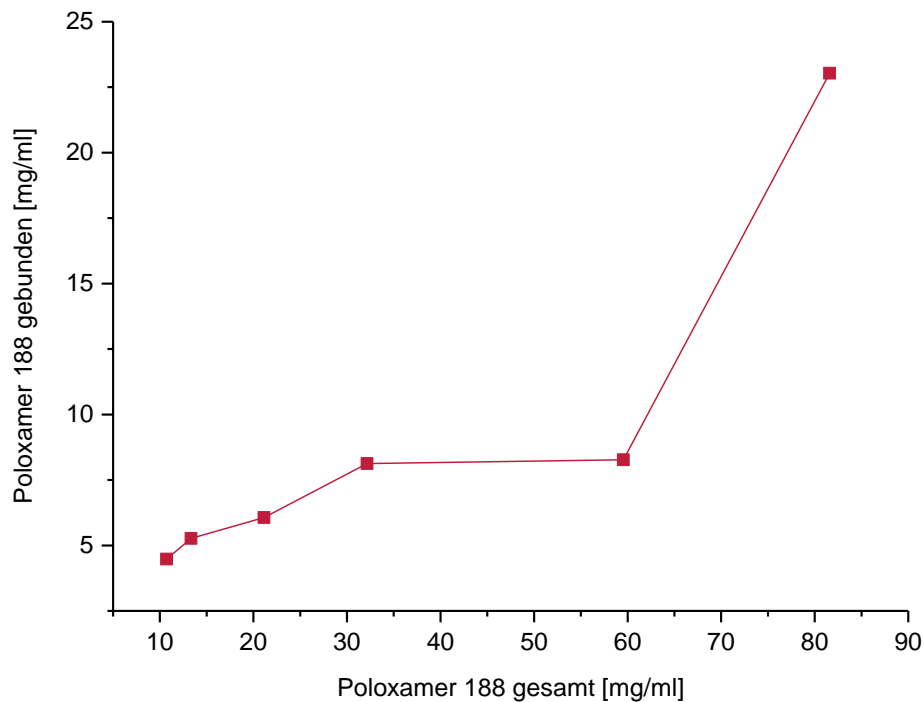


Abbildung 4-38: Korrelation der an den Partikeln gebundene Menge Poloxamer mit der Menge an Gesamt-Poloxamer in der Emulsion. Die TM-Nanopartikel wurden 1+19 mit Pol 188-Lösungen verschiedener Konzentrationen verdünnt und anschließend wurde die wässrige Phase mittels Vivaspin® abfiltriert. Die Gehaltsbestimmung des Gesamt-Pol-Gehaltes und der freien Pol-Menge im Filtrat wurden mittels NMR durchgeführt, anschließend die Pol-Menge im Filtrat mit der entsprechenden Lipidmenge korrigiert und durch Subtraktion der Gehalt des gebundenen Pol 188 errechnet.

Im Filtrat wurden nur sehr geringe Mengen oder gar kein TM (stets unter 0,01%) gefunden. Dies bestätigte zwar, dass die Membranfilter für die Nanopartikel praktisch unpassierbar waren, allerdings wurde aufgrund des geringen Lipidgehaltes in den Proben die ermittelte Menge des Pol 188 im Filtrat um den ebenfalls mittels NMR quantifizierten Lipidanteil in der Emulsion korrigiert (vgl. Kapitel 4.3.3). Durch Subtraktion der Menge an Emulgator in der wässrigen Phase von der ermittelten Gesamt-Konzentration konnte auf die Menge an gebundenem Pol 188 geschlossen werden. Diese Menge wurde anschließend auf den entsprechenden Lipidgehalt normiert und ist als mg pro 100 mg Lipid angegeben (Gleichung 5). Die Ergebnisse (Abbildung 4-38) zeigten folgende Korrelation: mit steigender Gesamt-Pol-Konzentration nahm tendenziell auch die Menge an gebundenem Pol an der Partikelgrenzfläche zu. Bei genauerer Betrachtung der Probe 7,5% (1) (Abbildung 4-37) fiel auf, dass es hier zu unplausiblen Werten kam, da die Menge an gebundenem Pol 188 normiert auf 100 mg Lipid die Menge am Gesamt-Pol überstieg. Da die Messungen nur einmal durchgeführt wurden, konnten Messfehler und Ausreißer nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt sind die Ergebnisse

daher nur als Annäherungen zu betrachten und unbedingt durch weitere Messungen zu verifizieren.

Unter Betrachtung der T_{Krit} im Vergleich mit den einzelnen Pol-Fractionen (Abbildung 4-39) konnte ebenfalls eine Tendenz beobachtet werden: die T_{Krit} sank mit steigendem Pol 188-Gehalt. Diese Korrelation konnte bei den Ergebnissen des auf den Lipid-Gehalt normierten Anteils an gebundenem Pol 188 allerdings nicht durchgehend beobachtet werden. Da hier im Vergleich zu den Dialyse-Untersuchungen (Abbildung 4-35) in einem niedrigeren Konzentrationsbereich gearbeitet wurde, konnte keine Annäherung an ein Plateau beobachtet werden und weitere Emulgatorzugabe führte zu weiterem Absinken der T_{Krit} . Da die T_{Krit} bei weiterer Emulgatorzugabe nicht konstant blieb, konnte davon ausgegangen werden, dass die Partikeloberfläche noch nicht vollständig mit Pol-Molekülen abgesättigt war und sich weitere Moleküle mit steigender Konzentration anlagerten. Dies wurde auch durch die quantitativen Ergebnisse der NMR-Analyse bestätigt. Die Korrelation der T_{Krit} mit der Pol-Konzentration führte allerdings nicht zu einem treppenartigen Aussehen wie die in der Literatur beschriebene Adsorptionsisotherme, die den Übergang von einer planaren Konformation bei geringer

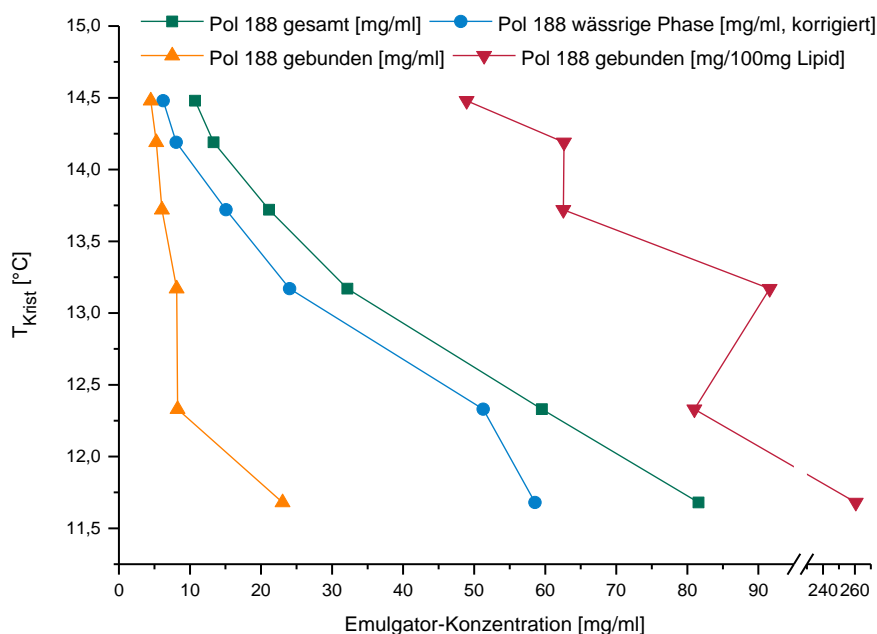


Abbildung 4-39: Korrelation der T_{Krit} mit der über NMR ermittelten Pol 188-Konzentration von TM-Nanopartikeln. Dargestellt sind die Werte für Gesamt-Pol 188 (Pol gesamt), Pol 188 in der wässrigen Phase (Pol wässrige Phase, korrigiert), die mittels Vivaspin® abfiltriert wurde, der Partikel und der gebundene Poloxamer 188-Gehalt (Pol GF, theoretisch durch Subtraktion der Konzentration des Filtrats (Pol wässrige Phase) vom Gesamt-Pol-Gehalt (Pol gesamt) ermittelt, sowie der auf die Lipidmenge normierte Anteil von gebundenem Pol 188 (mg pro 100 mg Lipid) gegen die T_{Krit} .

Grenzflächenbelegung zu einer kompakten Haarnadel-Konformation mit hoher Grenzflächenkonzentration zeigt [113,116].

Insgesamt scheinen die Ergebnisse der unterschiedlichen Methoden zur Einstellung der TM-Emulsionen auf unterschiedliche Mengen Pol doch einige Unterschiede aufzuweisen: dies könnte zum einen an der Probenaufbereitung liegen, denn bei einer Dialyse steht viel mehr Zeit zur Gleichgewichtseinstellung zu Verfügung als bei der Verdünnungsmethode. Zusätzlich wurden in dieser Versuchsreihe kleinere Partikel verwendet (z-Av. 80 nm), die eine größere spezifische Oberfläche besitzen, wodurch ein direkter Vergleich mit den größeren Partikeln aus den Dialyse-Experimenten (z-Av. 150 nm) erschwert ist.

Die genauen Zusammenhänge sind noch nicht ausreichend untersucht und bedürfen weiterer Experimente. So sind Wiederholungen der Verdünnungsexperimente sowie Wiederholungen der Quantifizierung des Pol-Gehalts notwendig, um zuverlässige Trends und Schlussfolgerungen ableiten zu können. Zusätzlich sollte die gebundene Menge Pol auf die vorhandene Grenzfläche der Partikel normiert werden, um letztendlich auf die Grenzflächenbelegungsdichte schließen zu können und genauere Informationen zur Konformation der Pol-Moleküle zu erhalten. Außerdem scheint die Ermittlung der Sättigungsgrenze für weiterführende Erkenntnisse wichtig zu sein.

5 Abschlussdiskussion

Kolloidale Trägersysteme werden unter anderem hinsichtlich ihrer Einsatzmöglichkeiten als *drug targeting*-Systeme zur parenteralen Applikation von lipophilen Arzneistoffen intensiv untersucht. Einen wichtigen Aspekt stellt dabei die Untersuchung des Freisetzungsverhaltens der inkorporierten Wirkstoffe mit geeigneten Methoden dar, die die physiologischen Bedingungen des Applikationsortes möglichst genau widerspiegeln sollten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine solche Methode auf Grundlage der T_{Krist} -Messungen von TM-Nanoemulsionen entwickelt.

5.1 Einsatz der DSC für Wirkstoff-Transferuntersuchungen

Die neu entwickelte DSC-Methode zeigte sich als vielversprechende Untersuchungsmöglichkeit für die Wirkstofffreisetzung aus Lipidnanopartikeln unter bestimmten Voraussetzungen: sie ist unkompliziert, einfach zu handhaben und nicht auf Wirkstoffe mit bestimmten Eigenschaften, wie Fluoreszenz oder radioaktive Markierung, begrenzt, sodass echte Wirkstoffkandidaten getestet werden können. Einer der größten Vorteile ist, dass keine Trennung von Donor- und Akzeptorsystem für die Quantifizierung der freigesetzten Wirkstoffmenge notwendig ist: Unter den gewählten Messbedingungen kristallisieren nur die TM-Donorpartikel, während die Bestandteile der verwendeten Akzeptormedien, wie Rapsöl-Nanoemulsionstropfen oder Blut und Serum, keinen Phasenübergang zeigen. Aus diesem Grund ist es möglich die Wirkstofffreisetzung aus den TM-Partikeln ohne vorherige Trennung von den Akzeptorpartikeln über die Änderung ihrer T_{Krist} zu verfolgen. Dadurch wird die Verwendung einer großen Anzahl von verschiedenen Akzeptorsystemen möglich und erlaubt auch den Einsatz von physiologischen Medien. Dies stellt einen Vorteil z.B. gegenüber der von Castelli et al. entwickelten Methode dar, die die Wirkstofffreisetzung in unilamellare Vesikel als Biomembranmodell über die Änderung der Übergangstemperatur der liposomalen Phospholipide untersuchten [153,154]. Da diese Methode auf dem Einsatz von liposomalen Phospholipiden basiert, ist keine Variation der Akzeptorpartikel möglich.

Die erreichbare Zeitauflösung in der neu entwickelten DSC-Freisetzungsmethode ist, bedingt durch die Dauer jeder Kristallisationsmessung von etwa 10 Minuten, allerdings etwas geringer als bei anderen Methoden [64,95]. Eine sehr schnelle Wirkstofffreisetzung kann mit dieser Methode also nicht in Echtzeit verfolgt werden. Es ist jedoch möglich zwischen einer schnellen und einer verzögerten Wirkstofffreisetzung zu unterscheiden. Der Einsatz kolloidaler Arzneistoffträger ist, neben der Solubilisation von lipophilen Arzneistoffen, unter anderem

auch für *drug targeting*- Strategien interessant. Hierbei es wichtig ist, dass der Wirkstoff nicht sofort nach Applikation freigesetzt wird, sondern zusammen mit seinem Trägerpartikel bis zum Erreichen des Zielortes in der Blutbahn zirkuliert. Die mit der DSC-Methode erreichbare Zeitauflösung sollte für die Entscheidung ausreichend sein, ob ein Wirkstoff lange genug mit dem Trägerpartikel assoziiert bleibt, um eine realistische Chance zu haben, zum Zielort transportiert zu werden.

Nachteilig ist die Beschränkung der einsetzbaren Donorpartikel auf unterkühlte TM-Nanodispersionen und ähnliche Systeme, wie zum Beispiel Trilaurin- oder Hartfett-Nanopartikel anzusehen [45,49]. Aus diesem Grund ist die DSC-Methode nicht universell für Freisetzungsuntersuchungen einsetzbar. Allerdings kann sie sehr gut als vergleichende Technik für die Validierung anderer neu entwickelter Freisetzungsmethoden und für grundlegende Untersuchungen zum besseren Verständnis der einflussnehmenden Faktoren auf die Wirkstofffreisetzung eingesetzt werden.

Die hier durchgeführten Messungen stellen keinesfalls Routinemessungen der DSC dar. Um den Wirkstofftransfer zu verfolgen, wird die $T_{K_{rist}}$ bis zu der zweiten Nachkommastelle ausgewertet. Bei niedrigeren Wirkstoffbeladungen ist die Änderung in der $T_{K_{rist}}$ allerdings nicht sehr groß, sodass schon geringe Mess-Schwankungen zu größeren Standardabweichungen führen können. Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, müssen diese Messschwankungen durch viele Kontrollmessungen identifiziert und in der Berechnung der Freisetzungsergebnisse berücksichtigt werden.

Da die $T_{K_{rist}}$ der Donorpartikel nach vollständiger Wirkstofffreisetzung nicht zugänglich ist, musste durch die Verwendung der $T_{K_{rist}}$ der unbeladenen Kontrollpartikel für die Berechnung des Anteils an freigesetztem Wirkstoff eine zusätzliche Unsicherheit in Kauf genommen werden: Die $T_{K_{rist}}$ der unbeladenen Kontrollpartikel wird benutzt, um eine vollständige Wirkstofffreisetzung darzustellen. Allerdings werden die beladenen und die unbeladenen Partikel zwar unter gleichen Bedingungen, aber in verschiedenen Ansätzen hergestellt, sodass es sich lediglich um eine Annäherung an die wahre $T_{K_{rist}}$ nach vollständiger Wirkstofffreisetzung handelt und es zu Abweichungen kommen kann. Diese könnten dann zu einer scheinbaren Wirkstofffreisetzung von über 100 % führen, wie in den Studien für OL beobachtet wurde. Ein Lösungsansatz für diese Ungenauigkeit könnte der Einsatz der passiven Beladung darstellen [40,129]. Hierbei werden zuerst unbeladene TM-Nanopartikel hergestellt, die anschließend mit den entsprechenden Wirkstoffen inkubiert und beladen werden. Durch diese Art der Beladung wird sichergestellt, dass beladene und unbeladene Partikel aus dem

gleichen Ansatz stammen und die gleiche Ausgangs- T_{Krist} haben, wodurch die Identifizierung der vollständigen Wirkstofffreisetzung vereinfacht wird. Bedauerlicherweise funktioniert die passive Beladung nicht mit allen Substanzen, besonders nicht mit sehr lipophilen Wirkstoffen wie zum Beispiel Ubidecarenon [40]. Vorversuche zeigten auch einen Einfluss des verwendeten Emulgators auf die Anwendbarkeit der passiven Beladung. So wurden Unterschiede für Pol 188- und Pol 407-stabilisierte Partikel gefunden (Kapitel 4.2.4.2): eine passive Beladung mit BMV war für Pol 407-stabilisierte TM-Partikel nicht möglich. Für diese Substanz wird eine Lokalisation an der Partikeloberfläche postuliert [131]. Infolgedessen könnte es zu einer Konkurrenz zwischen den Tensid- und den Wirkstoffmolekülen gekommen sein, wobei sich das Pol 407 nicht von der Grenzfläche verdrängen zu lassen schien und so die Beladung verhinderte. Die passive Beladung von Pol 188-stabilisierten TM-Partikeln mit BMV war hingegen ohne Probleme möglich und konnte sowohl über ein Absinken der T_{Krist} als auch über eine photometrische Quantifizierung bestätigt werden (Kapitel 4.2.1.2). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit einer vergleichenden Studie von Torcello-Gómez et al., die ebenfalls zeigte, dass sich Pol 188 viel leichter von der Partikelgrenzfläche verdrängen lässt als Pol 407 [133]. Der größere PPO-Block des Pol 407 scheint durch eine stärkere Verankerung in der hydrophoben Oberfläche dafür verantwortlich zu sein. Eine passive Beladung der Pol 407-stabilisierten TM-Partikel mit FB ist hingegen möglich (Kapitel 4.2.4), da der Wirkstoff im Partikelinneren lokalisiert ist [130] und so in keiner Konkurrenz mit den Tensidmolekülen um den Platz an der Partikelgrenzfläche steht.

Die hier durchgeführten Transferstudien in den physiologischen Akzeptormedien wurden auf einen Zeitraum von vier Stunden begrenzt. Nach dieser Zeit kam es zu Veränderung des Kristallisationsverhaltens der TM-Partikel, wodurch die Quantifizierung des Wirkstofftransfers über die Änderungen der T_{Krist} unmöglich wurde. Diese Veränderungen sind vermutlich auf den Abbau der Triglycerid-Partikel durch Lipasen zurückzuführen. Die Durchführung der Experimente bei der physiologischen Temperatur von 37 °C führte zu einem noch schnelleren Abbau der Donorpartikel, bedingt durch temperaturabhängige Erhöhung der Lipase-Aktivität. Diese Gegebenheit verhinderte die Durchführung der Transferstudien bei 37 °C. Theoretisch wäre es möglich, mit gleichzeitiger Durchführung mehrerer Kontrollen, den Wirkstofftransfer auch nach diesen vier Stunden zu verfolgen. Dafür müssten die Änderungen der T_{Krist} , bedingt durch die Interaktion mit Serum- bzw. Blutbestandteilen, von der T_{Krist} der Probe subtrahiert werden. Allerdings muss dann auch die physiologische Wirkung der untersuchten Wirkstoffe berücksichtigt werden. Der freigesetzte Wirkstoff könnte die Lipaseaktivität beeinflussen, wie es beispielsweise für OL und FB zu erwarten ist, und würde zu unberechenbaren Entwicklungen

führen, sodass trotz Kontrollen keine sichere Quantifizierung der freigesetzten Wirkstoffmenge mit dieser Methode möglich wäre. Ein Unterdrücken der Enzymaktivität durch vorherige Hitzebehandlung des Mediums könnte eine Möglichkeit sein, um die effektive Zeit der Untersuchungen zu verlängern [155]. Auch der Zusatz von Lipase-Inhibitoren wäre denkbar, allerdings müsste man hier eine mögliche Beladung der Donorpartikel mit überschüssigem Lipase-Inhibitor während der Freisetzungsuntersuchungen ausschließen. Zu bedenken ist, dass man durch diese Ansätze zwar den Untersuchungszeitraum verlängern kann, aber im Gegenzug auch von der Widerspiegelung realer Bedingungen am Applikationsort abrücken würde. Bei der Applikation von Arzneistoffzubereitungen in den menschlichen Blutstrom unterliegen die hier verwendeten Partikel einem natürlichen Abbau durch Lipasen, wodurch auch Wirkstoffe mit postulierter verzögerter Freisetzung frühzeitig aus den Partikelfragmenten entlassen werden könnten. Die Optimierung dieser neu entwickelten Methode im Hinblick auf eine Verlängerung des Untersuchungszeitraumes ist nur dann sinnvoll, wenn auch die verwendeten Trägerpartikel über einen verlängerten Zeitraum stabil bleiben. Die Freisetzung von schwer wasserlöslichen Wirkstoffen steht damit in direktem Zusammenhang mit der Lipolyserate der Trägerpartikel [156,157]. Die Interaktionen von Grenzflächenstrukturen, wie beispielsweise Emulgatoren, mit physiologischen Medien bestimmten die molekulare Zusammensetzung und Struktur an der Partikelgrenzfläche und daher auch das Ausmaß der Lipolyse. Daher müssen grundlegende Studien zum Design von *drug delivery*-Systemen sorgfältig überlegt und gestaltet werden, um die komplexe *in vivo*-Situation zu berücksichtigen. Diese Freisetzungsmethode ermöglicht die Verfolgung der Wirkstofffreisetzung in Blut und Serum bis zur Degradation der Trägerpartikel durch Lipasen.

Die neu entwickelte DSC-Methode bietet einige entscheidende Vorteile hinsichtlich der Transferuntersuchung schwer wasserlöslicher Arzneistoffe nach intravenöser Applikation im Vergleich zu Freisetzungsmethoden, die mit wässrigen Akzeptormedien arbeiten. Durch den Einsatz von physiologischen Akzeptormedien wie Serum und Blut ist es möglich, die physiologischen Bedingungen am Applikationsort realistisch darzustellen und die Freisetzungen möglichst realitätsnah zu untersuchen. In einigen Studien auf Basis wässriger Akzeptormedien wurde zwar die Löslichkeit der Wirkstoffe durch Zusätze wie Albumin [5], Emulgatoren [53,88,158] oder organischen Lösemitteln [89] optimiert, allerdings spiegeln diese dennoch nicht die realen Bedingungen am Applikationsort wider, wo (Lipo-)Proteine und Zellkomponenten als lipophile Akzeptoren für den gelösten Wirkstoff fungieren.

Bisher beschriebene Lösungsansätze, die ebenfalls Akzeptormedien mit lipophilen Anteilen einsetzen, sind der DSC-Methode unterlegen: so weisen sie entweder durch den Einsatz einer

lipophilen Bulk-Phase [64,90] eine zu kleine Phasengrenzfläche auf oder benötigen zum Beispiel bei Einsatz eines Akzeptorsystems aus Liposomen und Lipiddispersionen im Mikro- und Nanometerbereich [91–93] eine aufwendige Separation. Der Einbau von lipophilen Akzeptor-Nanopartikeln in Calcium-Alginat-Partikel [95] kombinierte zwar die Vorteile kleiner Akzeptorpartikel mit ihrer großen Oberfläche mit den Vorteilen einer einfachen Separation der größeren Partikel durch Filtration, allerdings kann die Diffusionsbarriere der Hydrogelmatrix den Wirkstofftransfer beschränken.

Zusätzlich weist die DSC-Methode auch Vorteile gegenüber anderen *in situ*-Methoden auf: Diese benötigen zwar keine Separation von Donor- und Akzeptorpartikeln, allerdings müssen die verwendeten Wirkstoffe bestimmte Eigenschaften, wie z.B. Fluoreszenz oder radioaktive Markierung, aufweisen [82,85,86], damit der freigesetzte Anteil detektiert werden kann. Somit ist die Anwendbarkeit dieser Methode auf bestimmte Wirkstoffe limitiert, während in der DSC-Methode solche Eigenschaften nicht nötig sind und echte Wirkstoffkandidaten untersucht werden können.

5.2 Transferergebnisse

Die Ergebnisse der Transferuntersuchungen dieser Studien zeigten, dass verschiedene Faktoren das Wirkstofftransferverhalten zwischen Donor- und Akzeptorpartikeln beeinflussen. Die Lipophilie des jeweiligen Wirkstoffs, eingeschätzt anhand des logP-Wertes, war einer der entscheidenden Faktoren. FB wurde als Wirkstoff mit der geringsten Lipophilie (logP 5,7) ausgewählt und zeigte den schnellsten Transfer innerhalb der ersten Minuten. OL hat einen etwas höheren logP-Wert (7,0) und wurde leicht verzögert aus den Partikeln freigesetzt. TPA (logP 10,7) ist lipophiler und es konnte ein sehr langsamer Transfer beobachtet werden. Q10 weist die höchste Lipophilie (log 19,1) in der Reihe aller untersuchten Wirkstoffe auf und es konnte praktisch keine Wirkstofffreisetzung innerhalb des Zeitrahmens der durchgeführten Experimente festgestellt werden. Die Ergebnisse deuten auf eine Korrelation zwischen der Freisetzung und dem logP-Wert des Wirkstoffs hin: je höher der logP, desto langsamer erfolgt die Wirkstofffreisetzung. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit Schlussfolgerungen aus *in vivo*-Studien von Takino et al. Diese postulierten, dass ein logP-Wert von etwa 9 erforderlich ist, um eine verzögerte Wirkstofffreisetzung aus kolloidalen Lipidemulsionen zu erreichen [48]. Auch weitere Studien konnten eine Abhängigkeit des Transfers von der Lipophilerie der untersuchten Substanzen feststellen [64].

Das Transferverhalten scheint ebenso von der Struktur und dem Massenverhältnis des verwendeten lipophilen Akzeptorsystems abhängig zu sein. FB wurde in einer Rapsöl-

Nanoemulsion annähernd vollständig freigesetzt, in Schweineserum und Schweineblut jedoch in einer nur vergleichsweise geringen Menge. In diesen physiologischen Medien wurde der Transfer aufgrund einer geringeren Menge an verfügbaren lipophilen Akzeptoren limitiert. Die Ergebnisse mit zwei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen deuteten ebenso auf eine Abhängigkeit der freigesetzten Wirkstoffmenge von dem Verhältnis zwischen Donor und verfügbarem Akzeptor hin: Mit zunehmendem Anteil an Akzeptor stieg der Anteil an freigesetztem Wirkstoff. Dass dem Wirkstofftransfer vermutlich ein gleichgewichtsgesteuerter Prozess zugrunde liegt, konnte auch schon in anderen Studien beobachtet werden [64,95]. Der Anstieg des Wirkstofftransfers nach Zugabe von zusätzlichen lipophilen Akzeptoren (Rapsöl-Nanoemulsion zu FB-beladenen Partikeln in Schweineserum und Schweineblut) unterstützt diese Annahme.

Eine postulierte Behinderung der Freisetzung von Wirkstoffen in physiologischen Medien durch die Bildung einer Protein-Hülle um die Trägerpartikel [138] spielte bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transferstudien keine Rolle.

Die zu Beginn der Methodenentwicklung eingesetzte Rapsöl-Nanoemulsion sollte als einfaches Modellsystem die im Blut vorhandenen lipophilen Akzeptoren simulieren. Allerdings führte dieses Modellsystem im Hinblick auf die freigesetzten Wirkstoffmengen nicht zu den gleichen Ergebnissen wie die physiologischen Akzeptormedien Schweineblut und Schweineserum. Die Rapsöl-Nanoemulsion schien einen höheren Anteil an lipophilen Akzeptorkomponenten zu besitzen, wodurch mehr Wirkstoff aus den Partikeln freigesetzt wurde. Da sie aber als Modellsystem eingesetzt werden und daher auch die physiologischen Bedingungen im Blut realistisch nachstellen soll, ist eine Angleichung des Lipidmassenanteils an die physiologischen Medien erforderlich, um vergleichbare Transferergebnisse zu erhalten. Auf der anderen Seite könnte der höhere Lipidmassenanteil in der Rapsöl-Nanoemulsion eine Möglichkeit bieten, um einen Nachteil der neu entwickelten DSC-Methode zu kompensieren: Die Verdünnung der TM-Donorpartikel ist wegen Schwierigkeiten in der reproduzierbaren Auswertung von sehr kleinen Kristallisationspeaks auf 1+99 begrenzt. Um eine realistische Verdünnung im Hinblick auf die Verabreichung im Menschen zu erreichen, müssten die Freisetzungsuntersuchungen bei deutlich höheren Mischungsverhältnissen durchgeführt werden. Bei einem durchschnittlichen Blutvolumen des Menschen von 5 Litern und einem hypothetischen Injektionsvolumen der Arzneistoffträger von 5 ml wäre ein Mischungsverhältnis von 1+999 für die *in vitro* Freisetzungsuntersuchungen sinnvoll. Bei diesem hohen Mischungsverhältnis stehen viel mehr lipophile Akzeptoren zu Verfügung, die bedingt durch das Verteilungsgleichgewicht zu einem deutlich höheren Anteil an freigesetztem Wirkstoff führen würden. Durch die Verwendung

eines auf einer Rapsöl-Nanoemulsion-basierten Akzeptorsystems könnte eventuell mit Mischungsverhältnissen, die in der DSC noch auswertbar sind, eine Annäherung an die realen lipophilen Bedingungen im Blutstrom erreicht werden. In diesem Zusammenhang ist auch die Verwendung von Mischungen aus physiologischen Medien und einer Rapsöl-Nanoemulsion möglich. Solche Mischungen wären eine interessante Möglichkeit, um die verwendbare Akzeptorvielfalt zu erweitern und immer weiter den physiologischen Bedingungen anzupassen.

Aufgrund der nur sehr beschränkten Verfügbarkeit von Donorsystemen für die DSC-Methode wäre es auch denkbar, dass die vorgestellte Trimyristin-Nanodispersion als Akzeptorsystem verwendet wird. Man hätte in diesem Fall eine größere Auswahl an verwendbaren Donorsystemen und könnte die Vorteile der DSC-Methode ausnutzen: Der Wirkstofftransfer könnte ebenfalls über die Änderung der T_{Krist} der TM-Partikel detektiert werden, wodurch keine Separation von Donor- und Akzeptorsystem notwendig wäre. Die Versuche mit den Miglyol 812-Partikeln und den Sojaöl-Nanopartikeln zeigten allerdings, dass es auch zwischen Donor- und Akzeptorpartikeln zu Interaktionen wie beispielsweise Lipidtransfer oder Übergang von Verunreinigungen kommen kann, die letztendlich die Kristallisation der TM-Partikel beeinflussen und die Detektion des Wirkstofftransfers über die Änderung der T_{Krist} erschweren. Für eine Realisierbarkeit der Verwendung der TM-Partikel als Akzeptorsystem wären also umfangreiche Voruntersuchungen notwendig. Zusätzlich stellt das Mischungsverhältnis ein Problem in diesen Überlegungen dar: Es müsste die Mindestmenge an Wirkstoff bestimmt werden, die noch zu einer signifikanten Änderung der T_{Krist} der TM-Partikel führt, um den Wirkstofftransfer verfolgen zu können. Bei sehr hohen Donor-Akzeptor-Mischungsverhältnissen (beispielsweise 1+99) würde wahrscheinlich zu wenig Wirkstoff auf zu viele TM-Partikel freigesetzt werden, um die T_{Krist} noch signifikant verändern zu können.

5.3 Grenzflächenphänomene

Bei der Entwicklung der neuen Freisetzungsmethode wurde beobachtet, dass die Verdünnung von Pol 188-stabilisierten TM-Nanopartikeln mit Wasser zu einer Veränderung ihrer T_{Krist} führte. In weiterführenden Untersuchungen konnte eine Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis bzw. dem daraus resultierenden Emulgatorgehalt der Dispersion festgestellt werden: je höher die Verdünnung, desto höher wurde die T_{Krist} der TM-Partikel. Da die neu entwickelte DSC-Methode zur Untersuchung der Freisetzung auf der Verwendung der T_{Krist} als Indikator für Veränderungen der Wirkstoffbeladung basiert, wurde auch hier eine Veränderung der Partikelzusammensetzung vermutet. Durch die Verdünnung der Dispersion kommt es vermutlich aufgrund der Volumenvergrößerung der wässrigen Phase zu einer Störung

des Emulgatorgleichgewichts zwischen der Partikelgrenzfläche und der wässrigen Phase. Diese wird anschließend durch Umverteilung von Tensidmolekülen bzw. durch deren Desorption von der Partikelgrenzfläche wieder neu eingestellt [109,116]. Eine Verdünnung von Systemen, die mit alternativen Emulgatoren mit jeweils sehr niedriger CMC (SL, Tylox, Pol 407 und PL/SGC) stabilisiert wurden, führte zu keiner Veränderung der T_{Krist} der TM-Partikel. Die vorhandenen Mizellen konnten sich zur Erhöhung der Monomerenkonzentration in der wässrigen Phase auflösen und so für die Ausbildung eines neuen Gleichgewichts sorgen, ohne dass sich die Emulgatorkonzentration an der Partikelgrenzfläche änderte. Pol 188 hingegen besitzt eine außerordentlich hohe CMC, die in den Experimenten nie überschritten wurde, sodass sich in der wässrigen Phase der Dispersion keine Mizellen befanden. Zur Ausbildung des neuen Gleichgewichts nach Verdünnung sind nun vermutlich die Emulgatormoleküle infolge des Konzentrationsgefälles von der Partikelgrenzfläche desorbiert. Diese Veränderung der Partikelzusammensetzung in Abhängigkeit der Verdünnungsrate beeinflusste maßgeblich das Kristallisationsverhalten der TM-Nanopartikel.

Weiterführende Experimente untermauerten diese Hypothese und zeigten keine Verschiebung der T_{Krist} von Pol 188-stabilisierten TM-Nanopartikeln, wenn diese zuvor dialysiert und anschließend mit dem Dialysemedium verdünnt wurden. Nach der Dialyse wiesen die wässrige Phase der Dispersion und das Dialysemedium die gleiche Emulgatorkonzentration auf, sodass es bei einer Verdünnung der Partikel zu keiner Störung des Emulgatorgleichgewichts in der Probe kam, worauf hin auch die T_{Krist} konstant blieb.

Sowohl die Einstellung des Pol 188-Gehals mittels Dialyse als auch die Separation der TM-Partikel durch die Membranzentrifugation mit Hilfe von Vivaspins[®] sollten eine Quantifizierung der Emulgatorkonzentration in der wässrigen Phase mittels NMR ermöglichen [125], die wiederum den Rückschluss auf den tatsächlichen Anteil des gebundenen Pol an den Partikeln zulassen sollte.

Die in den dazu durchgeführten Experimenten erhaltene Ergebnisse waren allerdings leider mit einer Reihe von Unsicherheiten behaftet. Dennoch zeichnete sich bei Variation des Pol-Gehaltes eine gewisse Tendenz ab, die insbesondere in den Vivaspin[®]-Experimenten zu erkennen war: je höher die Konzentration des Pol an der Partikel-Grenzfläche, desto niedriger ist die entsprechende T_{Krist} .

Grundlegende Sorptionsstudien zum Grenzflächen- und Oberflächenverhalten von Poloxameren zeigten eine Abhängigkeit der resultierenden Konformation der adsorbierten Emulgatormoleküle von der Oberflächenkonzentration [113,116,159], deren Ergebnisse zu den

hier mittels DSC gewonnenen Daten zum Grenzflächenverhalten des Pol 188 passen. Bei geringer Oberflächenbelegung nehmen die Tenside eine planare Konformation ein [67,109], bei der ihre PPO- und PEO-Ketten viele Kontaktpunkte zur hydrophoben Oberfläche haben, was eine Desorption dieser Schicht eher unwahrscheinlich macht [113]. Bei Erhöhung der Konzentration kommt es zu weiterer Anlagerung von Pol-Molekülen, wodurch sich die Konformation der adsorbierten Moleküle von der locker planaren in eine dicht gepackte Haarnadel-Konformation ändert [109]. So passen insgesamt mehr Moleküle an die Grenzfläche, was die Abnahme der T_{Krist} erklären könnte. Da nun die PEO-Blöcke desorbieren und die PPO-Blöcke aufgrund der Konformationsänderung weniger Kontaktfläche mit der hydrophoben Oberfläche aufweisen und deshalb nicht so stark verankert sind, könnten diese Verbindungen bei Verdünnungs- und Auswaschprozessen leichter brechen, was zu einer Desorption der Moleküle von der Oberfläche und einer daraus resultierenden Steigung der T_{Krist} führen würde. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass durch eine steigende Emulgatorkonzentration an der Grenzfläche die Abstoßungskräfte zwischen den sich immer weiter annähernden PPO- und PEO-Ketten zunehmen und so eine Desorption der Moleküle erleichtern [117]. Die verbleibenden Moleküle entspannen sich aufgrund der verfügbaren Oberfläche nun wieder, nehmen eine planare Konformation ein und bleiben vermutlich irreversibel adsorbiert. Svitova et al. postulierten eine irreversibel adsorbierte Pol 188-Schicht sowohl in der planaren, als auch in der Haarnadel-Konformation, die sich nicht durch Waschvorgänge entfernen lässt [113]. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass einige zitierte Studien nicht an der Wasser-Öl-Grenzfläche durchgeführt wurden, was bei möglichen Vergleichen zu berücksichtigen ist.

Die erhaltenen Ergebnisse deuten in dem untersuchten Konzentrationsbereich allerdings nicht auf eine irreversibel adsorbierte Schicht von Monomeren hin: bei sinkendem Gesamt-Poloxamer-Gehalt sank auch der Anteil an gebundenem Poloxamer (Abbildung 4-38). Die hier erlangten DSC-Ergebnisse lassen auch aufgrund der aufgestellten Korrelation zwischen T_{Krist} und Pol 188-Konzentration an der Grenzfläche durchaus eine Desorption der Moleküle durch Verdünnung vermuten. Zusätzlich führte die Dialyse von Pol 188-stabilisierten TM-Partikel gegen Wasser scheinbar zu einer unzureichenden Menge an Stabilisator in der Nanoemulsion, sodass die vorher stabile Emulsion in makroskopisch sichtbare Partikel auskristallisiert ist (Kapitel 4.3.3). Allerdings muss beachtet werden, dass eine Dialyse nicht unbedingt mit einer normalen Verdünnung des Systems verglichen werden kann, da die Dialyse viel mehr Zeit in Anspruch nimmt und einen höheren Desorptionsdruck aufbaut. Die verdünnten Partikel wurden unmittelbar nach der Verdünnung vermessen, sodass insgesamt viel weniger Zeit für eine

Desorption der Monomere war. Durch eine längere Lagerung der verdünnten Partikel könnten eventuell unterschiedliche Ergebnisse erhalten werden, da sich dann auch ein erhöhter Desorptionsdruck aufbauen würde. Da aber vor allem die Stabilität und Integrität von parenteral applizierbaren Arzneistoffträgersystemen, besonders auch nach Verdünnung im Blut, wichtig ist, sind Kenntnisse zum Sorptionsverhalten der verwendeten Stabilisatoren von großer Wichtigkeit. Die meisten Sorptionsstudien werden unter den Gesichtspunkten der Adsorption durchgeführt. Untersuchungen zu Desorptionsvorgängen der Polymere lassen sich hingegen nur sehr selten finden. Die Stabilität von intravenös einsetzbaren kolloidalen Systemen ist allerdings abhängig von der stabilen Adsorption des Emulgators.

Es wären weitere Untersuchungen notwendig, um zu bestimmen, inwieweit diese Desorptionsprozesse wirklich fortschreiten können. Hierbei wäre es wichtig, auch quantitative Analysen des Pol-Gehalts durch NMR nach Verdünnungen durchzuführen, um die mindestens für die Stabilisierung nötige Menge zu bestimmen und das Vorhandensein einer irreversibel adsorbierten Pol-Schicht zu untersuchen. Es wären Verdünnungen von ca. 1+999 notwendig, da dies ungefähr der Verdünnung eines parenteral applizierbaren Trägersystems im Blutsystem entspricht.

Auf Basis der erarbeiteten Ergebnisse könnte untersucht werden, inwiefern es möglich ist, zur Stabilisierung bei der Herstellung eingesetztes Pol 188 anschließend wieder von der Grenzfläche zu entfernen und durch einen anderen Emulgator zu ersetzen. Mittels einer stufenweise durchgeführten Dialyse mit stetigem Mediumwechsel könnte das Pol 188 an der Grenzfläche auf ein Minimum reduziert und anschließend durch Konkurrenz mit einem anderen Emulgator komplett von der Grenzfläche verdrängt werden. So wäre es möglich, aus einem Ansatz unterschiedlich stabilisierte Systeme herzustellen, um diese so noch besser in verschiedenen Untersuchungen miteinander vergleichen zu können.

Durch die vielfältigen Untersuchungen des Verhaltes der Emulgatoren mittels DSC, Dialyse und NMR konnten wesentliche Unterschiede zwischen Pol 188 und Pol 407 gezeigt werden, die in guter Übereinstimmung zu anderen Studien stehen [133,134]. Es wurde beobachtet, dass sich die beiden Blockcopolymere in einigen Bereichen, wie passive Beladung mit Wirkstoffen, Abbau und Verdünnung von TM-Nanopartikeln, völlig unterschiedlich verhalten. Bei Betrachtung des molekularen Aufbaus wird deutlich, dass Pol 407 mit seinem größeren lipophilen PPO-Block die Nanopartikel-Oberfläche umfassender bedeckt und dadurch die Adsorption von Fremdmolekülen behindert. So wird beispielsweise die Anlagerung von Lipasen erschwert, wodurch der Abbau der Triglycerid-Partikel langsamer stattfindet, als bei

den Pol 188-stabilisierten Partikeln, die sich wiederum leichter von der Oberfläche verdrängen lassen [134]. Die hier mittels DSC erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass die T_{Krist} der Pol 407-stabilisierten Partikel bei den Abbauprobungen langsamer anstieg als die T_{Krist} der Pol 188-stabilisierten Partikel. Das Ansteigen der T_{Krist} spiegelte den Verlauf des Abbaus wider, da die durch Lipolyse freiwerdenden Fettsäuren grenzflächenaktiv sind und so vermutlich die T_{Krist} beeinflussten. Zusätzlich scheint der größere PPO-Block des Pol 407 die Moleküle besser in hydrophoben Oberflächen zu verankern, wodurch sie nicht so einfach desorbieren oder sich von Fremdmolekülen verdrängen lassen [133]. Das scheint auch der Grund zu sein, warum eine passive Beladung von Pol 407-stabilisierten TM-Systemen mit an der Partikeloberfläche lokalisierten Wirkstoffen wenig erfolgsversprechend ist. So konnte gezeigt werden, dass Pol 407-stabilisierte TM-Nanopartikel nicht mit allen Wirkstoffen passiv beladen werden konnten, wenn diese an der Partikelgrenzfläche lokalisiert sind (beispielsweise BMV) und es so zu einer Konkurrenz kommt (Kapitel 4.2.4.2).

6 Zusammenfassung

Viele neue pharmazeutische Wirkstoffe und Wirkstoffkandidaten sind schlecht wasserlöslich und ihre Formulierung stellt die Pharmazeutische Technologie vor eine große Herausforderung. Lipidnanopartikel stellen ein vielversprechendes Trägersystem für diese Wirkstoffe dar und können aufgrund ihrer Teilchengröße in Nanometerbereich direkt in die Blutbahn appliziert werden. Um die Einsatzmöglichkeiten dieser kolloidalen Trägersysteme bewerten zu können, sind Kenntnisse über ihr Wirkstofffreisetzungsverhalten nach der Applikation wichtig. Die verwendeten Freisetzungsmedien sollten möglichst lipophile Akzeptorkompartimente, wie Lipoproteine oder andere kolloidale lipophile Strukturen erhalten, bzw. es sollten direkt physiologische Medien wie Blut oder Serum verwendet werden, um die physiologischen Bedingungen am Applikationsort widerzuspiegeln und die Freisetzung unter realitätsnahen Bedingungen zu untersuchen. Allerdings erschwert die geringe Größe der Trägerpartikel die Trennung von Donor- und Akzeptorsystem in Freisetzungsuntersuchungen unter solch realitätsnahen Bedingungen erheblich, da sie im selben Größenbereich wie die lipophilen Akzeptorpartikel liegt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode zur Bestimmung der Freisetzungseigenschaften von Lipidnanopartikeln unter realitätsnahen Bedingungen entwickelt, die ohne vorherige Trennung von Donor- und Akzeptorpartikel auskommt und mit echten Wirkstoffkandidaten ohne Notwendigkeit bestimmter Eigenschaften wie z.B. Fluoreszenz durchgeführt werden kann. Die Methode basiert auf der Messung der Kristallisationstemperatur von Trimyristin-Nanopartikeln mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie. Die Kristallisationstemperatur der Lipidnanopartikel sinkt proportional mit der Menge an eingeschlossenem Arzneistoff und erhöht sich entsprechend mit fortschreitender Wirkstofffreisetzung. Trimyristin-Nanoemulsionen wurden direkt bei der Herstellung mit den schwer wasserlöslichen Wirkstoffen Fenofibrat, Orlistat, α -D-Tocopherolacetat und Ubidecarenon beladen und ihre Freisetzung in drei unterschiedlichen Akzeptormedien mit steigender Komplexität und Annäherung an physiologische Bedingungen untersucht: in einer Rapsöl-Nanoemulsion sowie in Schweineserum und Schweineblut. Die Ergebnisse zeigten eine Korrelation der Freisetzungseigenschaften mit der Lipophilie der Wirkstoffe: je höher der logP-Wert, desto langsamer war die Freisetzung. Eine erhöhte Freisetzung in einer Rapsöl-Nanoemulsion im Vergleich zu Serum und Blut sowie bei gesteigertem Akzeptoranteil deutete darauf hin, dass das Ausmaß der Freisetzung von einem Verteilungsgleichgewicht bestimmt wurde.

Eine wichtige Voraussetzung für die Wirkstoffquantifizierung durch die Veränderung der Kristallisationstemperatur der Trimyristin-Nanopartikel ist, dass diese ausschließlich durch Wirkstofftransfer und nicht durch andere Umstände beeinflusst werden darf. Eine Herausforderung dieser Arbeit bestand daher zunächst in der Auswahl der Formulierung des Trägersystems. Die Stabilisierung der Trimyristin-Nanopartikel mit Poloxamer 188 stellte sich als problematisch heraus, da die Verdünnung der unbeladenen Partikel mit Wasser oder Akzeptormedien bereits zu einer unberechenbaren Verschiebung der Kristallisationstemperatur führte. Es wurde eine Veränderung der Partikelzusammensetzung und der Grenzflächenbelegung des Emulgators vermutet. Weitergehende Untersuchungen wiesen auf eine Abhängigkeit der Kristallisationstemperatur von der Poloxamer 188-Konzentration an der Partikelgrenzfläche hin. Bei Stabilisierung der Partikel mit Poloxamer 407, Saccharoselaurat, Tyloxapol und Lipoid S100/Natriumglycocholat kam es hingegen zu keiner Veränderung der Kristallisationstemperatur durch Verdünnung.

Außerdem wurde der Einfluss des zur Isotonisierung in der Partikelformulierung enthaltenen Glycerols auf die T_{Krist} untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass lediglich bei den mit Poloxamer 188-stabilisierten Partikeln die Glycerol-Zugabe zu einer Reduktion der T_{Krist} führte, während die mit den anderen Emulgatoren stabilisierten Partikel dieses Phänomen nicht zeigten. Die Hintergründe dieser spezifischen Interaktion von Poloxamer 188 und Glycerol an der Partikelgrenzfläche konnten nicht vollständig aufgeklärt werden.

Aufgrund der zuvor erhaltenen Ergebnisse wurde das zum Poloxamer 188 strukturell ähnliche Poloxamer 407 für die Stabilisierung der in den Freisetzungsexperimenten untersuchten Partikel verwendeten. Weitergehende Untersuchungen zum Verhalten der beiden Poloxamere hinsichtlich passiver Beladung mit Wirkstoffen, Verdünnung und Abbau der Trimyristin-Nanopartikeln in Serum und Blut führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die Ursache liegt vermutlich im molekularen Aufbau: Poloxamer 407 besitzt einen größeren lipophilen PPO-Block und scheint dadurch stärker in der Partikelgrenzfläche verankert zu sein. Da die passive Beladung der mit Poloxamer 407 stabilisierten Partikel dadurch erschwert bzw. nicht möglich war, wurden Trimyristin-Nanoemulsionen für die Freisetzungsuntersuchungen jeweils direkt bei der Herstellung beladen.

Insgesamt erwies sich die neu entwickelte DSC-Methode als vielversprechende Untersuchungsmöglichkeit für die Wirkstofffreisetzung aus Lipidnanopartikeln. Die Veränderungen der Kristallisationstemperatur bedingt durch einen Wirkstofftransfer müssen allerdings durch verschiedene Kontrollmessungen verifiziert, Messschwankungen identifiziert

und in der Berechnung der Freisetzungsergebnisse berücksichtigt werden. Die erreichbare Zeitauflösung ist ausreichend, um zwischen einer schnellen und einer verzögerten Wirkstofffreisetzung zu unterscheiden. Allerdings ist die Methode auf die Verwendung von unterkühlten Trimyristin-Donorpartikeln und ähnlichen Systemen angewiesen und daher nicht universell einsetzbar. Sie ist aber durchaus als vergleichende Technik für die Validierung anderer Untersuchungsmethoden geeignet, da echte Wirkstoffe in physiologischen Medien ohne großen apparativen Aufwand untersucht werden können.

7 Literaturverzeichnis

- [1] C.A. Lipinski, Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 44 (2000) 235–249.
- [2] P. van Hoogevest, X. Liu, A. Fahr, Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs: the industrial perspective, *Expert Opinion on Drug Delivery* 8 (2011) 1481–1500.
- [3] H. Bunjes, Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62 (2010) 1637–1645.
- [4] Europäisches Arzneibuch, Grundwerk, Ausgabe 9, Monographien, Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn, Eschborn (2017).
- [5] B. Magenheimer, M.Y. Levy, S. Benita, A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers - ultrafiltration technique at low pressure, *International Journal of Pharmaceutics* 94 (1993) 115–123.
- [6] H. Bunjes, M. Drechsler, M.H.J. Koch, K. Westesen, Incorporation of the model drug ubidecarenone into solid lipid nanoparticles, *Pharmaceutical Research* 18 (2001) 287–293.
- [7] V.J. Stella, K.W. Nti-Addae, Prodrug strategies to overcome poor water solubility, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 677–694.
- [8] S.L. Morissette, O. Almarsson, M.L. Peterson, J.F. Remenar, M.J. Read, A.V. Lemmo, S. Ellis, M.J. Cima, C.R. Gardner, High-throughput crystallization: Polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids, *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 275–300.
- [9] H. Gelderblom, J. Verweij, K. Nooter, A. Sparreboom, Cremophor EL: The drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation, *European Journal of Cancer* 37 (2001) 1590–1589.
- [10] S.V. Kurkov, T. Loftsson, Cyclodextrins, *International Journal of Pharmaceutics* 453 (2013) 167–180.
- [11] R.G. Strickley, Solubilizing excipients in oral and injectable formulations, *Pharmaceutical Research* 21 (2004) 201–230.
- [12] K.H. Bauer, K.-H. Frömming, C. Führer, *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (2002).
- [13] Y.E. Rahman, E.A. Cerny, K.R. Patel, E.H. Lau, B.J. Wright, Differential uptake of liposomes varying in size and lipid composition by parenchymal and kupffer cells of mouse liver, *Life Sciences* 31 (1982) 2061–2071.
- [14] O. Ishida, K. Maruyama, K. Sasaki, M. Iwatsuru, Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice, *International Journal of Pharmaceutics* 190 (1999) 49–56.

- [15] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine, *Trends in Biotechnology* 18 (2000) 412–420.
- [16] H. Maeda, The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting, *Advances in Enzyme Regulation* 41 (2001) 189–207.
- [17] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *Journal of Controlled Release* 65 (2000) 271–284.
- [18] A.L. Klibanov, K. Maruyama, V.P. Torchilin, L. Huang, Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes, *FEBS Letters* 268 (1990) 235–237.
- [19] L. Brannon-Peppas, J.O. Blanchette, Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 1649–1659.
- [20] I. Brigger, C. Dubernet, Couvreur P., Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (2002) 631–651.
- [21] G. Storm, S.O. Belliot, T. Daemen, D.D. Lasic, Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system, *Advanced Drug Delivery Reviews* 17 (1995) 31–48.
- [22] A. Puri, K. Loomis, B. Smith, J.-H. Lee, A. Yavlovich, E. Heldman, R. Blumenthal, Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 26 (2009) 523–580.
- [23] L. Nobs, F. Buchegger, R. Gurny, E. Allémann, Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93 (2004) 1980–1992.
- [24] K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, W.E. Rudzinski, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *Journal of Controlled Release* 70 (2001) 1–20.
- [25] R. Duncan, R. Gaspar, Nanomedicine(s) under the microscope, *Molecular Pharmaceutics* 8 (2011) 2101–2141.
- [26] S.S. Davis, C. Washington, P. West, L. Illum, G. Liversidge, L. Sternson, R. Kirsh, Lipid emulsions as drug delivery systems, *Annals of the New York Academy of Sciences* 507 (1987) 75–88.
- [27] J. Kuntsche, K. Westesen, M. Drechsler, M.H.J. Koch, H. Bunjes, Supercooled smectic nanoparticles: A potential novel carrier system for poorly water soluble drugs, *Pharmaceutical Research* 21 (2004) 1834–1843.
- [28] R.H. Müller, M. Radtke, S.A. Wissing, Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs, *International Journal of Pharmaceutics* 242 (2002) 121–128.
- [29] J. Kuntsche, J.C. Horst, H. Bunjes, Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems, *International Journal of Pharmaceutics* 417 (2011) 120–137.

-
- [30] A. Wretling, Development of fat emulsions, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 5 (1981) 230–235.
- [31] K. Hippalgaonkar, S. Majumdar, V. Kansara, Injectable lipid emulsions-advancements, opportunities and challenges, *Pharmaceutical Science and Technology Today* 11 (2010) 1526–1540.
- [32] C.C. Berton-Carabin, J.N. Coupland, R.J. Elias, Effect of the lipophilicity of model ingredients on their location and reactivity in emulsions and solid lipid nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 431 (2013) 9–17.
- [33] S. Joseph, H. Bunjes, Preparation of nanoemulsions and solid lipid nanoparticles by premix membrane emulsification, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101 (2012) 2479–2489.
- [34] J.H. Finke, J. Schur, C. Richter, T. Gothsch, A. Kwade, S. Büttgenbach, C.C. Müller-Goymann, The influence of customized geometries and process parameters on nanoemulsion and solid lipid nanoparticle production in microsystems, *Chemical Engineering Journal* 209 (2012) 126–137.
- [35] B. Strasdat, H. Bunjes, Incorporation of lipid nanoparticles into calcium alginate beads and characterization of the encapsulated particles by differential scanning calorimetry, *Food Hydrocolloids* 30 (2013) 567–575.
- [36] Rote Liste, Arzneimittelverzeichnis für Deutschland, Rote Liste® Service GmbH, Frankfurt am Main (2015).
- [37] K. Westesen, H. Bunjes, Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? *International Journal of Pharmaceutics* 115 (1995) 129–131.
- [38] H. Bunjes, Lipidsysteme zur parenteralen Anwendung - Nanoemulsionen und Lipidnanopartikel, in: K. Mäder, U. Weidenauer (Eds.), *Innovative Arzneiformen: Ein Lehrbuch für Studium und Praxis*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (2010), 187–206.
- [39] R.J. Pranker, V.J. Stella, The use of oil-in-water emulsions as a vehicle for parenteral drug administration, *Pharmaceutical Science and Technology Today* 44 (1990) 139–149.
- [40] K.M. Rosenblatt, H. Bunjes, Evaluation of the drug loading capacity of different lipid nanoparticle dispersions by passive drug loading, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 117 (2017) 49–59.
- [41] V. Andermark, K. Göke, M. Kokoschka, Abu El Maaty, M. A., C.T. Lum, T. Zou, R.W.-Y. Sun, E. Aguiló, L. Oehninger, L. Rodríguez, H. Bunjes, S. Wölfl, C.-M. Che, I. Ott, Alkynyl gold(I) phosphane complexes: Evaluation of structure-activity-relationships for the phosphane ligands, effects on key signaling proteins and preliminary in-vivo studies with a nanoformulated complex, *Journal of Inorganic Biochemistry* 160 (2016) 140–148.
- [42] S. Benita, D. Friedmann, M. Weinstock, Physostigmine emulsion: a new injectable controlled release delivery system, *International Journal of Pharmaceutics* 30 (1986) 47–55.

-
- [43] M.W. Lovell, H.W. Johnson, H.-W. Hui, J.B. Cannon, P.K. Gupta, C.C. Hsu, Less-painful emulsion formulations for intravenous administration of clarithromycin, *International Journal of Pharmaceutics* 109 (1994) 45–57.
- [44] A. Tibell, M. Larsson, A. Alvestrand, Dissolving intravenous cyclosporin A in a fat emulsion carrier prevents acute renal side effects in the rat, *Transplant International* 6 (1993) 69–72.
- [45] K. Westesen, H. Bunjes, M.H.J. Koch, Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential, *Journal of Controlled Release* 48 (1997) 223–236.
- [46] C. Washington, K. Evans, Release rate measurements of model hydrophobic solutes from submicron triglyceride emulsions, *Journal of Controlled Release* 33 (1995) 383–390.
- [47] L. Salmela, C. Washington, A continuous flow method for estimation of drug release rates from emulsion formulations, *International Journal of Pharmaceutics* 472 (2014) 276–281.
- [48] T. Takino, K. Konishi, Y. Takakura, M. Hashida, Long circulating emulsion carrier systems for highly lipophilic drugs, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 17 (1994) 121–125.
- [49] H. Bunjes, K. Westesen, M.H.J. Koch, Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics* 129 (1996) 159–173.
- [50] H. Bunjes, B. Siekmann, K. Westesen, Emulsions of supercooled melts - A novel drug delivery system, in: S. Benita (Ed.), *Submicron emulsions in drug targeting and delivery*, Harwood Academic Publ., Amsterdam (1998), 175–218.
- [51] S. Joseph, H. Bunjes, Solid lipid nanoparticles for drug delivery, in: D. Douroumis, A. Fahr (Eds.), *Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs*, Wiley, Chichester (2013), 103–118.
- [52] R.H. Müller, K. Mäder, S. Gohla, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50 (2000) 161–177.
- [53] F.Q. Hu, H. Yuan, H.H. Zhang, M. Fang, Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization, *International Journal of Pharmaceutics* 239 (2002) 121–128.
- [54] M.A. Schubert, C.C. Müller-Goymann, Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles – evaluation of the method and process parameters, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 55 (2003) 125–131.
- [55] M.R. Gasco, Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, *United States Patent* 5 250 236 (1993).
- [56] B. Siekmann, K. Westesen, Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 43 (1996) 104–109.

-
- [57] W. Mehnert, K. Mäder, Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications, *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012) 83–101.
- [58] H. Bunjes, F. Steiniger, W. Richter, Visualizing the structure of triglyceride nanoparticles in different crystal modifications, *Langmuir* 23 (2007) 4005–4011.
- [59] K. Westesen, M. Drechsler, H. Bunjes, Colloidal dispersions based on solid lipids, in: E. Dickinson, R. Miller (Eds.), *Food colloids: Fundamentals of formulation*, Royal Society of Chemistry, Cambridge (2001), 103–115.
- [60] H. Bunjes, Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 16 (2011) 405–411.
- [61] A. Zur Mühlen, C. Schwarz, W. Mehnert, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45 (1998) 149–155.
- [62] K. Jores, A. Haberland, S. Wartewig, K. Mäder, W. Mehnert, Solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded SLN studied by spectrofluorometry and raman spectroscopy, *Pharmaceutical Research* 22 (2005) 1887–1897.
- [63] K.M. Rosenblatt, H. Bunjes, Poly(vinyl alcohol) as emulsifier stabilizes solid triglyceride drug carrier nanoparticles in the alpha-modification, *Molecular Pharmaceutics* 6 (2009) 105–120.
- [64] S. Petersen, A. Fahr, H. Bunjes, Flow cytometry as a new approach to investigate drug transfer between lipid particles, *Molecular Pharmaceutics* 7 (2010) 350–363.
- [65] R.H. Müller, R. Shegokar, C.M. Keck, 20 years of lipid nanoparticles (SLN & NLC): Present state of development & industrial applications, *Current Drug Discovery Technologies* 8 (2011) 207–227.
- [66] M.J.W. Povey, Crystallization of oil-in-water emulsions, in: N. Garti, K. Sato (Eds.), *Crystallization processes in fats and lipid systems*, Taylor & Francis, New York (2001), 251–288.
- [67] L.W. Phipps, Heterogeneous and homogeneous nucleation in supercooled triglycerides and n-paraffins, *Journal of Chemical Society* 60 (1964) 1873–1883.
- [68] H. Bunjes, M.H.J. Koch, K. Westesen, Effects of surfactants on the crystallization and polymorphism of lipid nanoparticles, *Progress in Colloid and Polymer Science* 121 (2002) 7–10.
- [69] N. Garti, K. Sato, *Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids*, M. Dekker, New York (1988).
- [70] H. Bunjes, K. Westesen, Influences of colloidal state on physical properties of solid fats, in: N. Garti, K. Sato (Eds.), *Crystallization processes in fats and lipid systems*, Taylor & Francis, New York (2001), 457–483.
- [71] Urška Treiber, Applicability of differential scanning calorimetry for the determination of drug concentration in lipid nanoparticles. Diploma Thesis, Univerza v Ljubljani (2014).

-
- [72] H. Bunjes, T. Unruh, Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 379–402.
- [73] W.J. Gibbs, T.M. Hagemann, Purified poloxamer 188 for sickle cell vaso-occlusive crisis, *The Annals of Pharmacotherapy* 38 (2004) 320–324.
- [74] R.H. Müller, S. Maaßen, H. Weyhers, F. Specht, J.S. Lucks, Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics* 138 (1996) 85–94.
- [75] C. Olbrich, O. Kayser, R.H. Müller, Enzymatic degradation of dynasan 114 SLN - Effect of surfactants and particle size, *Journal of Nanoparticle Research* 4 (2002) 121–129.
- [76] S.M. Moghimi, I. Hamad, Factors controlling pharmacokinetics of intravenously injected nanoparticulate systems, in: M.M. de Villiers, P. Aramwit, G.S. Kwon (Eds.), *Nanotechnology in drug delivery. Biotechnology: Pharmaceutical aspects*, 10th ed., Springer, New York (2009), 267–282.
- [77] J. Rossi, J.-C. Leroux, Principles in the development of intravenous lipid emulsions, in: K.M. Wasan (Ed.), *Role of lipid excipients in modifying oral and parenteral drug delivery*, John Wiley & Sons, Hoboken (2007), 88–122.
- [78] S. Yang, C. Washington, Drug release from microparticulate systems, in: S. Benita (Ed.), *Microencapsulation: Methods and industrial applications*, Taylor & Francis Group, New York (2006), 183–211.
- [79] F. Cui, K. Shi, L. Zhang, A. Tao, Y. Kawashima, Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: Preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation, *Journal of Controlled Release* 114 (2006) 242–250.
- [80] N. Chidambaram, D.J. Burgess, A novel in vitro release method for submicron-sized dispersed systems, *American Association of Pharmaceutical Scientists* 1 (1999) 32–40.
- [81] S.S. D'Souza, P.P. DeLuca, Methods to assess in vitro drug release from injectable polymeric particulate systems, *Pharmaceutical Research* 23 (2006) 460–474.
- [82] C. Washington, Drug release from microdisperse systems: a critical review, *International Journal of Pharmaceutics* 58 (1990) 1–12.
- [83] M.Y. Levy, S. Benita, Drug release from submicronized o/w emulsion: a new in vitro kinetic evaluation model, *International Journal of Pharmaceutics* 66 (1990) 29–37.
- [84] B. Boyd, Characterisation of drug release from cubosomes using the pressure ultrafiltration method, *International Journal of Pharmaceutics* 260 (2003) 239–247.
- [85] F.B. Landry, D.V. Bazile, G. Spenlehauer, M. Veillard, J. Kreuter, Release of the fluorescent marker Prodan® from poly(D,L-lactic acid) nanoparticles coated with albumin or polyvinyl alcohol in model digestive fluids (USP XXII), *Journal of Controlled Release* 44 (1997) 227–236.

-
- [86] K.M. Rosenblatt, D. Douroumis, H. Bunjes, Drug release from differently structured monoolein/poloxamer nanodispersions studied with differential pulse polarography and ultrafiltration at low pressure, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96 (2007) 1564–1575.
- [87] H.M. Redhead, S.S. Davis, L. Illum, Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation, *Journal of Controlled Release* 70 (2001) 353–363.
- [88] C.-H. Hsu, Z. Cui, R.J. Mumper, M. Jay, Preparation and characterization of novel coenzyme Q10 nanoparticles engineered from microemulsion precursors, *American Association of Pharmaceutical Scientists* 4 (2003) 269–280.
- [89] D.-B. Chen, T.-z. Yanf, W.-L. Lu, Q. Zhang, In vitro and in vivo study of two types of long-circulating solid lipid nanoparticles containing Paclitaxel, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 49 (2001) 1444–1447.
- [90] V. Jennings, M. Schäfer-Korting, S. Gohla, Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties, *Journal of Controlled Release* 66 (2000) 115–126.
- [91] J.A. Shabbits, G.N.C. Chiu, L.D. Mayer, Development of an in vitro drug release assay that accurately predicts in vivo drug retention for liposome-based delivery systems, *Journal of Controlled Release* 84 (2002) 161–170.
- [92] H. Hefesha, S. Loew, X. Liu, S. May, A. Fahr, Transfer mechanism of temoporfin between liposomal membranes, *Journal of Controlled Release* 150 (2011) 279–286.
- [93] J.A. Hellings, H.H. Kamp, K.W.A. Wirtz, L.L.M. Deenen, Transfer of phosphatidylcholine between liposomes, *European Journal of Biochemistry* 47 (1974) 601–605.
- [94] A.M.H.P. van den Besselaar, G.M.J. Helmkamp, K.W.A. Wirtz, Kinetic model of the protein-mediated phosphatidylcholine exchange between single bilayer liposomes, *Biochemistry* 14 (1975) 1852–1858.
- [95] B. Strasdat, H. Bunjes, Development of a new approach to investigating the drug transfer from colloidal carrier systems applying lipid nanosuspension-containing alginate microbeads as acceptor, *International Journal of Pharmaceutics* 489 (2015) 203–209.
- [96] A. Hinna, F. Steiniger, S. Hupfeld, M. Brandl, J. Kuntsche, Asymmetrical flow field-flow fractionation with on-line detection for drug transfer studies: A feasibility study, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (2014) 7827–7839.
- [97] G. Fontana, M. Licciardi, S. Mansueto, D. Schillaci, G. Giammona, Amoxicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake, *Biomaterials* 22 (2001) 2857–2865.
- [98] M.L. Bondi, G. Fontana, B. Carlisi, G. Giammona, Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing cloricromene, *Drug Delivery* 10 (2003) 245–250.

-
- [99] C. Decker, F. Steiniger, A. Fahr, Transfer of a lipophilic drug (temoporfin) between small unilamellar liposomes and human plasma proteins: Influence of membrane composition on vesicle integrity and release characteristics, *Journal of Liposome Research* 23 (2013) 154–165.
- [100] A.V. Kabanov, E.V. Batrakova, V.Y. Alakhov, Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery, *Journal of Controlled Release* 82 (2002) 189–212.
- [101] A.V. Kabanov, J. Zhu, V. Alakhov, Pluronic block copolymers for gene delivery, *Advances in Genetics* 53 (2005) 231–261.
- [102] G. Dumortier, J.L. Grossiord, F. Agnely, J.C. Chaumeil, A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics, *Pharmaceutical Research* 23 (2006) 2709–2728.
- [103] T. Reintjes, Kolliphor P grades (Poloxamers), in: T. Reintjes (Ed.), *Solubility enhancement with BASF pharma polymers. Solubilizer compendium.*, BASF SE, Lampertheim (2011), 103–111.
- [104] G. Wanka, H. Hoffmann, W. Ulbricht, Phase diagrams and aggregation behavior of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions, *Macromolecules* 27 (1994) 4145–4159.
- [105] P. Alexandridis, J.F. Holzwarth, T.A. Hatton, Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: Thermodynamics of copolymer association, *Macromolecules* 27 (1994) 2414–2425.
- [106] V.Y. Alakhov, A.V. Kabanov, Block copolymeric biotransport carriers as versatile vehicles for drug delivery, *Expert Opinion on Investigational Drugs* 7 (1998) 1453–1473.
- [107] J.S. Tan, D.E. Butterfield, C.L. Voycheck, K.D. Caldwell, J.T. Li, Surface modification of nanoparticles by PEO/PPO block copolymers to minimize interactions with blood components and prolong blood circulation in rats, *Biomaterials* 14 (1993) 823–833.
- [108] M.G. Muñoz, F. Monroy, F. Ortega, R.G. Rubio, D. Langevin, Monolayers of symmetric triblock copolymers at the air–water interface. 1. Equilibrium properties, *Langmuir* 16 (2000) 1083–1093.
- [109] M.G. Muñoz, F. Monroy, F. Ortega, R.G. Rubio, D. Langevin, Monolayers of symmetric triblock copolymers at the air–water interface. 2. Adsorption kinetics, *Langmuir* 16 (2000) 1094–1101.
- [110] P. Ramírez, J. Muñoz, V.B. Fainerman, E.V. Aksenenko, N. Mucic, R. Miller, Dynamic interfacial tension of triblock copolymers solutions at the water–hexane interface, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 391 (2011) 119–124.
- [111] P. Ramírez, A. Stocco, J. Muñoz, R. Miller, Interfacial rheology and conformations of triblock copolymers adsorbed onto the water–oil interface, *Journal of Colloid and Interface Science* 378 (2012) 135–143.

-
- [112] J.B. Vieira, Z.X. Li, R.K. Thomas, J. Penfold, Structure of triblock copolymers of ethylene oxide and propylene oxide at the air/water interface determined by neutron reflection, *The Journal of Physical Chemistry B* 106 (2002) 10641–10648.
- [113] T.F. Svitova, C.J. Radke, AOT and pluronic F68 coadsorption at fluid/fluid interfaces: A continuous-flow tensiometry study, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 44 (2005) 1129–1138.
- [114] B.A. Noskov, S.-Y. Lin, G. Loglio, R.G. Rubio, R. Miller, Dilational viscoelasticity of PEO-PPO-PEO triblock copolymer films at the air-water interface in the range of high surface pressures, *Langmuir* 22 (2006) 2647–2652.
- [115] L.M. Pérez-Mosqueda, J. Maldonado-Valderrama, P. Ramírez, M.A. Cabrerizo-Vílchez, J. Muñoz, Interfacial characterization of Pluronic PE9400 at biocompatible (air-water and limonene-water) interfaces, *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces* 111 (2013) 171–178.
- [116] P. Alexandridis, V. Athanassiou, S. Fukuda, T.A. Hatton, Surface activity of poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide) copolymers, *Langmuir* 10 (1994) 2604–2612.
- [117] B.R. Blomqvist, T. Wårnheim, P.M. Claesson, Surface rheology of PEO-PPO-PEO triblock copolymers at the air-water interface: Comparison of spread and adsorbed layers, *Langmuir* 21 (2005) 6373–6384.
- [118] A. Hambardzumyan, V. Aguié-Béghin, M. Daoud, R. Douillard, β -casein and symmetrical triblock copolymer (PEO–PPO–PEO and PPO–PEO–PPO) surface properties at the air–water interface, *Langmuir* 20 (2004) 756–763.
- [119] H.R. Patel, R.P. Patel, M.M. Patel, Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors, *International Journal of PharmTech Research* 1 (2009) 299–303.
- [120] H. Schott, Comparing the surface chemical properties and the effect of salts on the cloud point of a conventional nonionic surfactant, octoxynol 9 (Triton X-100), and of its oligomer, tyloxapol (Triton WR-1339), *Journal of Colloid and Interface Science* 205 (1998) 496–502.
- [121] A. Christiansen, T. Backensfeld, W. Weitschies, Effects of non-ionic surfactants on in vitro triglyceride digestion and their susceptibility to digestion by pancreatic enzymes, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 41 (2010) 376–382.
- [122] P. van Hoogevest, X. Liu, A. Fahr, M.L.S. Leigh, Role of phospholipids in the oral and parenteral delivery of poorly water soluble drugs, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 21 (2011) 5–16.
- [123] E. Söderlind, M. Wollbratt, C. van Corswant, The usefulness of sugar surfactants as solubilizing agents in parenteral formulations, *International Journal of Pharmaceutics* 252 (2003) 61–71.
- [124] L. Ernster, G. Dallner, Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function, *Biochimica et Biophysica Acta* 1271 (1995) 195–204.

-
- [125] K. Göke, E. Roese, A. Arnold, J. Kuntsche, H. Bunjes, Control over particle size distribution by autoclaving poloxamer-stabilized trimyristin nanodispersions, *Molecular Pharmaceutics* 13 (2016) 3187–3195.
- [126] A.G. Floyd, Top ten considerations in the development of parenteral emulsions, *Pharmaceutical Science and Technology Today* 2 (1999) 134–143.
- [127] B.-S. Chu, G.T. Rich, M.J. Ridout, R.M. Faulks, M.S.J. Wickham, P.J. Wilde, Modulating pancreatic lipase activity with galactolipids: Effects of emulsion interfacial composition, *Langmuir* 25 (2009) 9352–9360.
- [128] M. Ellrichmann, M. Kapelle, P.R. Ritter, J.J. Holst, K.-H. Herzig, W.E. Schmidt, F. Schmitz, J.J. Meier, Orlistat inhibition of intestinal lipase acutely increases appetite and attenuates postprandial glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide-1, cholecystokinin, and peptide YY concentrations, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 (2008) 3995–3998.
- [129] E. Kupetz, L. Preu, C. Kunick, H. Bunjes, Parenteral formulation of an antileishmanial drug candidate-tackling poor solubility, chemical instability, and polymorphism, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 85 (2013) 511–520.
- [130] E. Kupetz, H. Bunjes, Lipid nanoparticles: Drug localization is substance-specific and achievable load depends on the size and physical state of the particles, *Journal of Controlled Release* 189 (2014) 54–64.
- [131] K. Göke, H. Bunjes, Drug solubility in lipid nanocarriers: Influence of lipid matrix and available interfacial area, *International Journal of Pharmaceutics* 529 (2017) 617–628.
- [132] A. Torcello-Gómez, J. Maldonado-Valderrama, J. de Vicente, M.A. Cabrerizo-Vílchez, M.J. Gálvez-Ruiz, A. Martín-Rodríguez, Investigating the effect of surfactants on lipase interfacial behaviour in the presence of bile salts, *Food Hydrocolloids* 25 (2011) 809–816.
- [133] A. Torcello-Gómez, J. Maldonado-Valderrama, A.B. Jódar-Reyes, T.J. Foster, Interactions between Pluronics (F127 and F68) and bile salts (NaTDC) in the aqueous phase and the interface of oil-in-water emulsions, *Langmuir* 29 (2013) 2520–2529.
- [134] M. Wulff-Pérez, J. de Vicente, A. Martín-Rodríguez, M.J. Gálvez-Ruiz, Controlling lipolysis through steric surfactants: New insights on the controlled degradation of submicron emulsions after oral and intravenous administration, *International Journal of Pharmaceutics* 423 (2012) 161–166.
- [135] N. Bertrand, J.-C. Leroux, The journey of a drug-carrier in the body: An anatomophysiological perspective, *Journal of Controlled Release* 161 (2012) 152–163.
- [136] J.W. Nichols, Y.H. Bae, Odyssey of a cancer nanoparticle: From injection site to site of action, *Nano today* 7 (2012) 606–618.
- [137] P. Aggarwal, J.B. Hall, C.B. McLeland, M.A. Dobrovolskaia, S.E. McNeil, Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy, *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2009) 428–437.

-
- [138] S. Behzadi, V. Serpooshan, R. Sakhtianchi, B. Müller, K. Landfester, D. Crespy, M. Mahmoudi, Protein corona change the drug release profile of nanocarriers: The "overlooked" factor at the nanobio interface, *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces* 123 (2014) 143–149.
- [139] M.W. Elwell, R.F. Roberts, J.N. Coupland, Effect of homogenization and surfactant type on the exchange of oil between emulsion droplets, *Food Hydrocolloids* 18 (2004) 413–418.
- [140] M.E. Norman, P. Williams, L. Illum, Influence of block copolymers on the adsorption of plasma proteins to microspheres, *Biomaterials* 14 (1993) 193–202.
- [141] J.K. Jackson, C.M.K. Springate, W. Hunter, H.M. Burt, Neutrophil activation by plasma opsonized polymeric microspheres: inhibitory effect of pluronic F127, *Biomaterials* 21 (2000) 1483–1491.
- [142] J.C. Neal, S. Stolnik, E. Schacht, E.R. Kenawy, M.C. Garnett, S.S. Davis, L. Illum, In vitro displacement by rat serum of adsorbed radiolabeled poloxamer and poloxamine copolymers from model and biodegradable nanospheres, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 87 (1998) 1242–1248.
- [143] D. Jain, R. Athawale, A. Bajaj, S. Shrikhande, P.N. Goel, R.P. Gude, Studies on stabilization mechanism and stealth effect of poloxamer 188 onto PLGA nanoparticles, *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces* 109 (2013) 59–67.
- [144] S. Lang, A. Reng, P.C. Schmidt, Fiedler encyclopedia of excipients for pharmaceuticals, cosmetics and related areas, ECV Editio Cantor Aulendorf (2007).
- [145] I.R. Vlahov, P.I. Vlahova, R.J. Linhardt, Regioselective synthesis of sucrose monoesters as surfactants, *Journal of Carbohydrate Chemistry* 16 (1997) 1–10.
- [146] O. Regev, R. Zana, Aggregation behavior of tyloxapol, a nonionic surfactant oligomer, in aqueous solution, *Journal of Colloid and Interface Science* 210 (1999) 8–17.
- [147] T.S. Wiedmann, L. Kamel, Examination of the solubilization of drugs by bile salt micelles, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91 (2002) 1743–1764.
- [148] Y. Barenholz, Liposome application: problems and prospects, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 6 (2001) 66–77.
- [149] J.H. Lee, J.D. Andrade, Surface properties of aqueous PEO/PPO block copolymer surfactants, in: J.D. Andrade (Ed.), *Polymer surface dynamics*, Plenum Press, New York (1988), 119–136.
- [150] X. Song, S. Zhao, S. Fang, Y. Ma, M. Duan, Mesoscopic simulations of adsorption and association of PEO-PPO-PEO triblock copolymers on a hydrophobic surface: From mushroom hemisphere to rectangle brush, *Langmuir* 32 (2016) 11375–11385.
- [151] R. Ivanova, P. Alexandridis, B. Lindman, Interaction of poloxamer block copolymers with cosolvents and surfactants, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 183–185 (2001) 41–53.

- [152] T. Unruh, H. Bunjes, K. Westesen, M.H.J. Koch, Observation of size-dependent melting in lipid nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry B* 103 (1999) 10373–10377.
- [153] F. Castelli, C. Messina, R. Pignatello, G. Puglisi, Effect of pH on diclofenac release from eudragit RS100[®] microparticles. A kinetic study by DSC, *Drug Delivery* 8 (2001) 173–177.
- [154] M.L. Accolla, R. Turnaturi, M.G. Sarpietro, S. Ronsisvalle, F. Castelli, L. Pasquinucci, Differential scanning calorimetry approach to investigate the transfer of the multitarget opioid analgesic LP1 to biomembrane model, *European Journal of Medicinal Chemistry* 77 (2014) 84–90.
- [155] I.H. McGillivray, The inactivation of pancreatic lipase by heat, *Biochemical Journal* 24 (1930) 891–904.
- [156] I. Arimoto, H. Saito, Y. Kawashima, K. Miyajima, T. Handa, Effects of sphingomyelin and cholesterol on lipoprotein lipase-mediated lipolysis in lipid emulsions, *Journal of Lipid Research* 39 (1998) 143–151.
- [157] I. Arimoto, C. Matsumoto, M. Tanaka, K. Okuhira, H. Saito, T. Handa, Surface composition regulates clearance from plasma and triolein lipolysis of lipid emulsions, *Lipids* 33 (1998) 773–779.
- [158] E. Allémann, J.-C. Leroux, R. Gurny, E. Doelker, In vitro extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure, *Pharmaceutical Research* 10 (1993) 1732–1737.
- [159] K.N. Prasad, T.T. Luong, A.T. Florence, J. Paris, C. Vaution, M. Seiller, F. Puisieux, Surface activity and association of ABA polyoxyethylene—polyoxypropylene block copolymers in aqueous solution, *Journal of Colloid and Interface Science* 69 (1979) 225–232.

A Anhang

A1 Charakteristika der verwendeten kolloidalen Lipiddispersionen

Tabelle A-1: Detaillierte Auflistung der Bestandteile und Charakteristika der in der Arbeit verwendeten kolloidalen Lipiddispersionen

Dispersion	Matrix [%]	Emulgator [%]			Größe		Herstellung		Bemerkungen
					z-Av.	PdI	bar	Zyklen	
Donorsysteme									
ER05	TM	10	Pol 188	5	152	0,099	350	10	Ohne Glycerol
ER07	TM	10	Pol 188	5	150	0,101	350	10	
ER08	TM	10	Pol 188	5	152	0,107	350	10	
ER06	TM	10	Pol 188	5	86	0,098	350	10	
ER09M	TM	10	Pol 188	5	151	0,098	350	10	
ER09M_dia	TM	10	Pol 188	5	151	0,098	350	10	Dialysiert auf ca. 1,5% Pol 188
ER15	TM	10	Pol 188	5	147	0,109	350	10	Ohne Glycerol
ER16_P188	TM	10	Pol 188	5	156	0,100	350	10	
ER16_P407	TM	10	Pol 407	5	147	0,093	350	10	
ER20	TM	10	Pol 188	5	153	0,160	350	10	
ER22	TM	10	Pol 407	5	149	0,099	350	10	
ER13_FB	TM	10	Pol 188	5	152	0,010	350	10	Dialysiert auf ca. 1,5% Pol 188, mit 3% FB beladen*
ER23	TM	10	Pol 407	5	148	0,098	350	10	
ER23-M	Miglyol 812	10	Pol 407	5	155	0,103	350	10	
ER24	TM	10	Pol407	5	151	0,098	350	10	
ER27	TM	20	Pol 188	10	81	0,091	900	10	
ER24_FB	TM	10	Pol 407	10	151	0,010	350	10	
ER24_OL	TM	10	Pol 407	5	149	0,099	350	10	Mit 10% OL beladen**
ER24_TPA	TM	10	Pol 407	5	153	0,102	350	10	Mit 16,6% TPA beladen**
ER24_Q10	TM	10	Pol 407	5	152	0,100	350	10	Mit 20,7% Q10 beladen **
ER27	TM	20	Pol 188	10	81	0,091	900	10	Ohne Glycerol
ER14_P188	TM	10	Pol 188	5	146	0,121	350	10	
ER14_P407	TM	10	Pol 407	5	151	0,102	350	10	
ER14_Tylox	TM	10	Tylox	5	88	0,186	350	10	

Dispersion	Matrix [%]	Emulgator [%]			Größe z-Av. PdI		Herstellung bar Zyklen		Bemerkungen
ER14_PL/SGC	TM	10	PL	2,4	150	0,129	350	10	
			SGC	0,6					
ER14_SL	TM	10	SL	5	148	0,109	350	10	
Akzeptorsysteme									
ER13_R	Rapsöl	10	Pol 188	5	152	0,098	350	10	Dialysiert auf ca. 1,5% Pol 188
ER22_R	Rapsöl	10	Pol 407	5	150	0,100	350	10	
ER05-Soja	Sojaöl	10	Pol 188	5	143	0,102	700	10	Dialysiert auf ca. 1,5% Pol 188
ER12_Sesam	Sesamöl	10	Pol 188	5	110	0,117	900	10	Dialysiert auf ca. 1,5% Pol 188
ER12_Mais	Maisöl	10	Pol 188	5	107	0,121	900	10	Dialysiert auf ca. 1,5% Pol 188
ER12_Raps	Rapsöl	10	Pol 188	5	113	0,115	900	10	Dialysiert auf ca. 1,5% Pol 188
ER12_Erdnuss	Erdnuss- öl	10	Pol 188	5	120	0,123	900	10	Dialysiert auf ca. 1,5% Pol 188
ER12_Sonne	Sonnen- blumenöl	10	Pol 188	5	109	0,114	900	10	Dialysiert auf ca. 1,5% Pol 188
ER12_Mandel	Mandelöl	10	Pol 188	5	110	0,120	900	10	Dialysiert auf ca. 1,5% Pol 188

*aktiv beladen **passiv beladen

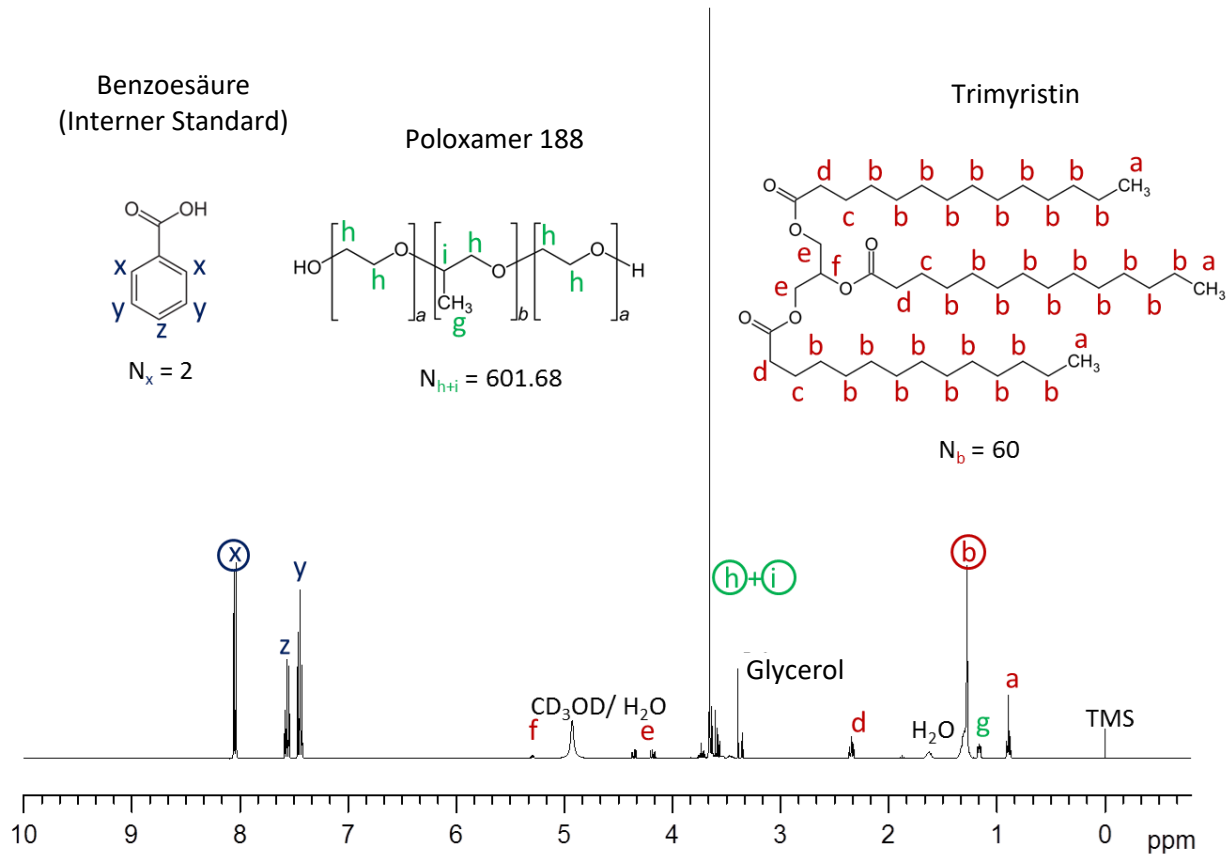
A2 ^1H -NMR-Spektrum

Abbildung A-2: Darstellung eines ^1H -NMR-Spektrums einer Trimyristin-Nanoemulsion und die Strukturformeln des internen Standards und der Analyten Poloxamer 188 und Trimyristin. Die Buchstaben ordnen die Protonen jedes Moleküls dem jeweiligen ^1H -NMR-Signal zu. Die eingekreisten Buchstaben geben die Signale an, deren relative Bereiche für die quantitative Analyse verwendet wurden. N gibt die Anzahl der äquivalenten Kerne an, wobei N für Poloxamer 188 keine ganze Zahl darstellt, da es aus der durchschnittlichen Molmasse der Substanz berechnet wurde [125]. Alle untersuchten Proben führten zu einem vergleichbaren Spektrum.

A3 Verifizierung der Gehaltsbestimmung: Vergleich der photometrisch mit den über Korrelation der Kristallisationstemperatur ermittelten Ergebnisse

Zur Verifizierung der Bestimmung der Wirkstoffbeladung auf Grundlage der T_{Krist} -Änderung wurden die Wirkstoffe photometrisch quantifiziert und die Ergebnisse miteinander verglichen. Es konnte sichergestellt werden, dass die T_{Krist} mit der Wirkstoffbeladung korreliert und beide Methoden annähernd gleiche Ergebnisse lieferten.

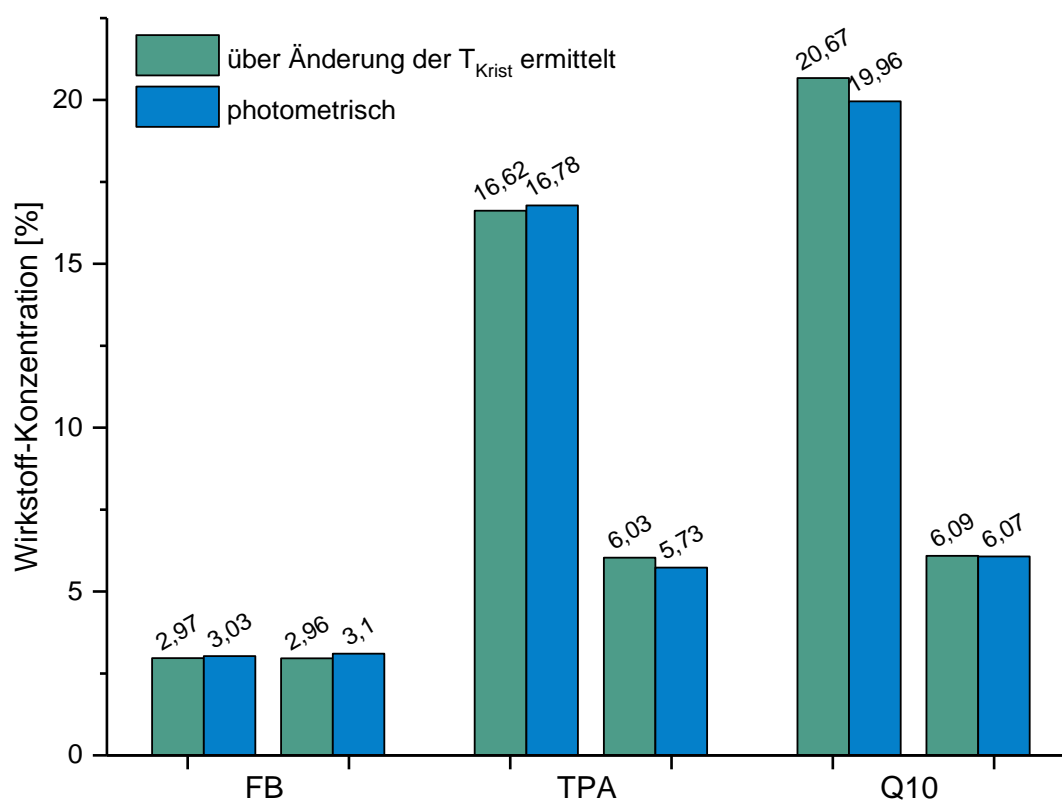


Abbildung A-3: Vergleich der beiden Methoden zur Gehaltsbestimmung der schwer wasserlöslichen Wirkstoffe Fenofibrat (FB), α -D-Tocopherolacetat (TPA) und Ubidecarenon (Q10) in TM-Nanopartikeln. Der Wirkstoffgehalt wurde anhand der Änderung der T_{Krist} im Vergleich zu einer unbeladenen TM-Emulsion ermittelt (grün) und zusätzlich photometrisch quantifiziert (blau).

A4 Poloxamer 188-Kalibriergerade am Refraktometer

Unterschiedlich konzentrierte Poloxamer 188-Lösungen wurden am Refraktometer dreifach vermessen und anhand der Brechungsindices eine Kalibriergerade aufgestellt. Es wurden jeweils Poloxamer-Lösungen mit Glycerol (2,25%) und ohne Glycerol verwendet, sodass zwei Kalibriergeraden resultierten. Mit Hilfe dieser Kalibriergeraden konnte der Pol 188-Gehalt in Dialysemedien und in abfiltrierten wässrigen Phasen bestimmt werden.

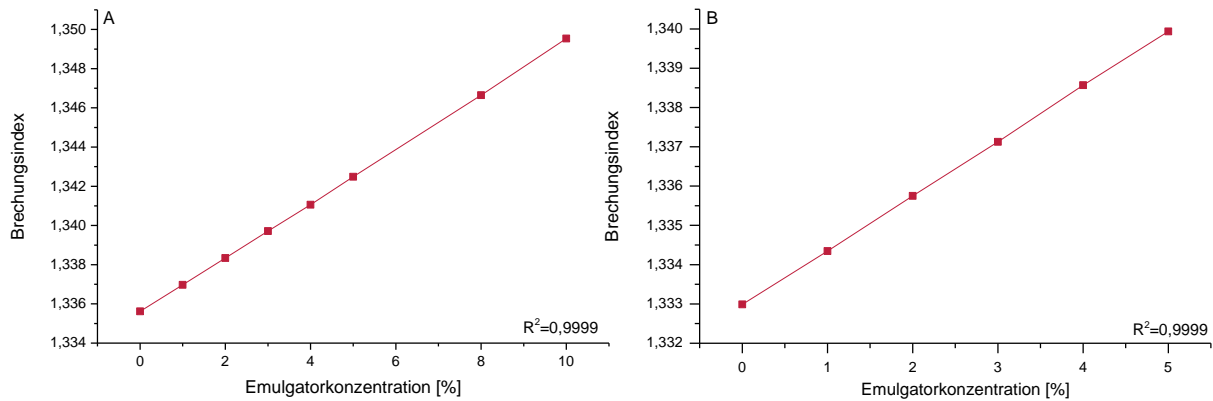


Abbildung A4: Kalibriergeraden von Poloxamer-188-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen. A= mit Glycerol, B= ohne Glycerol.